



Impacts des dépôts atmosphériques azotés sur la biodiversité et le fonctionnement des pelouses subalpines pyrénéennes

Marion Boutin

► To cite this version:

Marion Boutin. Impacts des dépôts atmosphériques azotés sur la biodiversité et le fonctionnement des pelouses subalpines pyrénéennes. Sciences de la Terre. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30185 . tel-01357681

HAL Id: tel-01357681

<https://theses.hal.science/tel-01357681>

Submitted on 30 Aug 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Marion BOUTIN

le lundi 28 septembre 2015

Titre :

Impacts des dépôts atmosphériques azotés sur la biodiversité et le
fonctionnement des pelouses subalpines pyrénéennes

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Écologie, biodiversité et évolution

Unité de recherche :

Laboratoire Evolution et Diversité Biologique (EDB) - UMR 5174

Directeur/trice(s) de Thèse :

André PORNON, Maître de Conférences (EDB), directeur

Thierry LAMAZE, Professeur des Universités (CESBIO), co-directeur

Jury :

Jean-Christophe CLEMENT, Maître de Conférences (LECA, Grenoble), rapporteur

Sylvain PLANTUREUX, Professeur des Universités (Univ. Lorraine - INRA, Nancy), rapporteur

Thomas SPIEGELBERGER, Chargé de Recherches (IRSTEA, Grenoble), rapporteur

Sylvain CHAILLOU, Professeur (AgroParisTech), président du jury

Avant-propos

Cette thèse a été financée pour une durée de trois ans par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (contrat doctoral avec charge d'enseignement) puis pour une durée de neuf mois par le Labex TULIP, la région Midi-Pyrénées et l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie). Ces recherches ont été réalisées dans le cadre du projet ANEMONE cofinancé par la Communauté de Travail des Pyrénées (régions Midi-Pyrénées N°11051284, Aquitaine N°1262C0013 et Huesca N°CTPP13/11), l'ADEME (N°1262C0013) et l'OHM (Observatoire Homme-Milieu) du Haut Vicdessos. Le projet ANEMONE a rassemblé cinq laboratoires de recherche français (le laboratoire Evolution et Diversité Biologique (EDB), le Centre d'Etudes Spatiales de la BIOSphère (CESBIO) et le laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement (ECOLAB) à Toulouse ; le laboratoire Biodiversité, Gènes et Communautés (BioGeCo) à Bordeaux et le laboratoire de Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes (B&PMP) à Montpellier), deux laboratoires de recherche espagnols (l'Institut Pyrénéen d'Ecologie (IPE-CSIC) à Huesca et Zaragoza, et le groupe Ecologie Fonctionnelle & Changement Global (ECOFUN-CTFC) à Solsona) et deux partenaires socio-économiques (le Conservatoire Botanique National de Pyrénées et Midi-Pyrénées (CBNPMP) à Bagnères-de-Bigorre, et le Parc National des Pyrénées (PNP) à Tarbes).

Remerciements

Tout d'abord, je remercie André et Thierry de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci pour votre disponibilité et vos conseils tout au long de ces quatre années. Merci aussi, et entre autres, pour être venus jouer les Shadoks sur le plateau de Beille ou vous être installés derrière le broyeur ou la balance quand le besoin s'en faisait sentir !

Je tiens à remercier Jean-Christophe Clément, Sylvain Plantureux et Thomas Spiegelberger pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs, ainsi que Sylvain Chaillou pour avoir accepté d'être président du jury.

Merci à tous les « amis d'ANEMONE » car cette thèse est indissociable de ce projet. Merci donc à Emmanuel Corcket, Didier Alard, Anne Probst, Gilles Corriol, Luís Villar, Juan-José Jiménez, Maria-Teresa Sebastià, Fabrice Gouriveau, Olivier Jupille et Enrique Navarro pour nos collaborations et discussions sur le terrain ou lors de nos meetings annuels. Merci également à Laurence Galsomiès, Gérard Largier, Eric Sourp, et Alain Gojon pour leur rôle dans l'existence de ce projet.

Un grand merci aux étudiants que j'ai eu le plaisir d'encadrer. Sans votre aide à tous, une bonne partie des données de cette thèse attendraient toujours, là-haut dans la montagne ou quelque part dans une pile de fiches de relevés... Merci donc à Ewelina Grzeskiewicz, Sebastien Haunold, Cédric Del Rio, Sébastien Olandini et Cian Blaix. Et mention spéciale aux heureux participants des semaines intensives de prélèvements à Beille : Juliette Archambeau, Cédric Lemaire et Maxime De Ronne pour l'édition 2013, et Aude Landré, Marine Picart et Julie Girard pour l'édition 2014 !

Merci au Syndicat des Propriétaires Indivis et aux gérants de l'espace nordique du Plateau de Beille pour avoir accepté l'installation de notre site expérimental. Et je n'oublie pas les précieux coups de main de Haifa Debouk, Teresa Marí, Adrien Claustres, Cyril Garneau, Simon Rizzetto, Jean-François Garrigues et Christine Ducamp pour diverses opérations sur le site.

Un grand merci à Frédéric Julien, Virginie Payre-Suc et Pascal Tillard pour les nombreuses analyses qu'ils ont réalisés pour ce travail et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes interrogations. Merci à Clothier Coste pour m'avoir initiée avec passion à la détermination des lichens, à Christophe Bergès pour son expertise botanique, à Vincent Rivalland pour m'avoir grandement aidé à récupérer et utiliser les données Safran, à Edith Reuzeau pour les analyses de sol à Bordeaux et à Laurent Risser et Sébastien Déjean pour avoir pris le temps de se pencher sur mes données.

Merci à tout le laboratoire EDB pour son accueil et plus particulièrement à Olivia, Coline, Julianne et Anne-Cécile. Anne-Cécile, un grand merci pour m'avoir si souvent écoutée râler (pour ceux qui en douteraient, si si ça m'arrive !) et pour notre petite compétition thérapeutique (dont je te déclare vainqueur au passage)!

Bien sûr, je remercie ma famille de m'avoir toujours soutenue dans mes choix et d'avoir su montrer de l'intérêt pour mon travail. Merci également à mes amis, avec une mention spéciale à Magali et Julie pour avoir été là pour me permettre de m'évader, que ce soit le temps d'une soirée ou d'une virée londonienne !

Enfin, Yoann, merci pour ta présence, ta patience et ton soutien sans faille. Merci d'avoir été là, jusque sur mes placettes expérimentales, un ciseau dans une main, des brins de Nard dans l'autre...

TABLE DES MATIERES

Avant-propos.....	3
Remerciements	5
TABLE DES MATIERES	7
Chapitre 1 Introduction générale	9
1.1. Cycle de l'azote et dépôts atmosphériques azotés	11
1.1.1. Flux entre diazote atmosphérique (N ₂) et azote réactif (Nr) à l'échelle de la biosphère	11
<i>a - Flux naturels.....</i>	<i>11</i>
<i>b - Perturbations anthropiques.....</i>	<i>12</i>
1.1.2. Azote réactif atmosphérique et processus de dépôts	13
1.1.3. Cycle de l'azote dans les écosystèmes naturels ou semi-naturels terrestres	15
<i>a - Transformations microbiennes dans le sol.....</i>	<i>15</i>
<i>b - Prélèvement et utilisation de l'azote par les plantes</i>	<i>16</i>
<i>c - Gains et pertes d'azote à l'échelle de l'écosystème.....</i>	<i>17</i>
1.1.4. Conséquences d'une augmentation des dépôts atmosphériques d'azote pour les écosystèmes terrestres naturels et semi-naturels	18
1.2. Dépôts atmosphériques azotés et pelouses subalpines.....	19
1.2.1. Présentation et particularités des pelouses subalpines.....	19
1.2.2. Problématique.....	20
1.2.3. Objectifs de la thèse	21
1.2.4. Modèle d'étude : les nardaias subalpines pyrénéennes.....	22
Chapitre 2 Dépôts atmosphériques azotés à l'étage subalpin dans les Pyrénées	25
2.1. Mesure des dépôts atmosphériques azotés et confrontation aux modèles de chimie-transport	27
2.1.1. Contexte et résumé	27
2.1.2. Article: Subalpine Pyrenees received higher nitrogen deposition than predicted by EMEP and CHIMERE chemistry-transport models	29
2.2. Test d'une méthode de biosurveillance des dépôts atmosphériques azotés par la teneur en azote de lichens	51
2.2.1. Contexte et résumé	51
2.2.2. Article : Can lichens be suitable biomonitors of low-level nitrogen deposition at the scale of a mountainous region?	53
Chapitre 3 Réponses de la végétation des pelouses subalpines pyrénéennes aux dépôts azotés et au changement climatique au cours des 60 dernières années	73
3.1. Contexte et résumé.....	75
3.2. Article: Nitrogen deposition and climate change increased vascular species richness and altered the composition of subalpine grasslands	77

Chapitre 4 Effets d'apports d'azote et de modifications microclimatiques sur le fonctionnement d'une pelouse subalpine pyrénéenne	107
4.1. Introduction.....	109
4.2. Matériel & Méthodes	111
4.2.1. Description du site	111
4.2.2. Traitements expérimentaux	113
<i>a - Apports d'azote.....</i>	<i>113</i>
<i>b - Changement climatique.....</i>	<i>114</i>
<i>c - Marquage ¹⁵N.....</i>	<i>116</i>
4.2.3. Echantillonnage et analyse de la végétation.....	117
<i>a - Relevés floristiques par la méthode des points-contact.....</i>	<i>117</i>
<i>b - Prélèvements des parties aériennes.....</i>	<i>117</i>
<i>c - Prélèvements des parties racinaires</i>	<i>117</i>
<i>d - Préparation et analyses élémentaires.....</i>	<i>118</i>
4.2.4. Echantillonnage et analyse du sol.....	118
4.2.5. Analyse des données	119
<i>a - Biomasses, recouvrements et hauteur de la végétation</i>	<i>119</i>
<i>b - Traçage isotopique</i>	<i>120</i>
<i>c - Analyses statistiques.....</i>	<i>120</i>
4.3. Résultats et discussion	121
4.3.1. Répartition et conservation de l'azote des apports dans l'écosystème ...	121
<i>a - Validation du protocole de marquage.....</i>	<i>121</i>
<i>b - Devenir de l'azote apporté dans l'écosystème</i>	<i>122</i>
<i>c - Effet de la quantité d'azote et des serres sur ce devenir</i>	<i>125</i>
4.3.2. Effets des apports d'azote et des serres sur la végétation et le sol.....	126
<i>a - Caractéristiques biochimiques et biomasse de la végétation.....</i>	<i>126</i>
<i>b - Composition et structure de la communauté végétale</i>	<i>135</i>
<i>c - Caractéristiques biochimiques du sol.....</i>	<i>137</i>
4.4. Conclusion	140
4.5. Perspectives de recherche	141
Chapitre 5 Conclusion générale et perspectives	143
5.1. Dépôts azotés dans les Pyrénées	145
5.2. Impacts sur les pelouses subalpines.....	146
5.2.1. Cohérence des effets observés à court et moyen terme.....	146
5.2.2. Perspectives	149
Références bibliographiques.....	151

Chapitre 1

Introduction générale

1.1. Cycle de l'azote et dépôts atmosphériques azotés

1.1.1. Flux entre diazote atmosphérique (N_2) et azote réactif (Nr) à l'échelle de la biosphère

L'azote (N) est un élément indispensable à la vie. C'est le quatrième élément le plus abondant dans les tissus vivants. On le retrouve, associé à d'autres éléments majeurs (oxygène, carbone, hydrogène, phosphore...), dans de nombreuses molécules organiques telles que les nucléotides (dans l'ADN, ARN, ATP...), les acides aminés libres, les protéines et de nombreux lipides membranaires. L'azote est un élément extrêmement abondant dans l'atmosphère, sous la forme de diazote (N_2) qui constitue l'atmosphère terrestre à près de 80 %. Cependant, cette forme est très peu réactive, souvent non directement utilisable par les organismes vivants du fait de la triple liaison, extrêmement stable, unissant les deux atomes. Par opposition, l'azote réactif (Nr) est actif de manière biologique, photochimique ou radiative et existe sous forme organique (par exemple : urée, protéines, ...) ou minérale (réduite : par exemple NH_3 , NH_4^+ ; ou oxydée : par exemple NO , NO_2 , N_2O , HNO_3 , NO_3^-).

a - Flux naturels

N_2 peut être transformé en Nr dans l'atmosphère sous l'effet des éclairs et par fixation biologique. La production de Nr par les orages dans la troposphère est due à la chaleur dégagée par les éclairs convertissant N_2 en NO , ensuite oxydé en NO_2 puis HNO_3 . Quantitativement, cette production est relativement limitée ($\approx 5 \text{ Tg N an}^{-1}$) et surtout notable dans les régions tropicales où les orages sont les plus fréquents (Tie *et al.*, 2002). La fixation biologique de l'azote est la principale source naturelle de Nr avec une production estimée à $\approx 58 - 128 \text{ Tg N an}^{-1}$ dans les écosystèmes naturels terrestres (Galloway *et al.*, 2004; Vitousek *et al.*, 2013) et à $\approx 140 \text{ Tg N an}^{-1}$ dans les océans (Voss *et al.*, 2013). Seuls les procaryotes possédant le complexe enzymatique de la dinitrogénase sont capables de casser la triple liaison du N_2 . Il s'agit de bactéries hétérotrophes et de cyanobactéries, vivant libres ou en symbiose. L'azote fixé par ces organismes est libéré dans le sol ou l'eau lors de leur décomposition.

A l'inverse, certaines bactéries utilisent le nitrate (NO_3^-) comme accepteur d'électrons en l'absence d'oxygène pour la respiration et convertissent une part de Nr en N_2 , il s'agit du processus de dénitrification. D'autres bactéries réalisent l'oxydation anaérobie de l'ammonium (Anammox) : $NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2 H_2O$. Dans les écosystèmes terrestres, la dénitrification est

favorisée par des sols riches en matière organique et NO_3^- , très humides et peu oxygénés. La libération de N_2 par dénitrification est estimée à $\approx 100 - 280 \text{ Tg N an}^{-1}$ dans les zones peu oxygénées des océans (Fowler *et al.*, 2013) et à $\approx 96 \text{ Tg N an}^{-1}$ dans les milieux continentaux (dont 68 Tg N an^{-1} dans les sols ; Bouwman *et al.*, 2013). L'oxydation anaérobie de l'ammonium a été découverte beaucoup plus récemment, dans les bioréacteurs de traitement des eaux usées (Mulder *et al.*, 1995). Depuis, ce processus a été observé dans les zones faiblement oxygénées des océans, sédiments, mangroves et lacs. La libération de N_2 par les écosystèmes aquatiques marins et continentaux à attribuer à l'oxydation anaérobie de l'ammonium plutôt qu'à la dénitrification reste encore discutée (Kuypers *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2009).

b - Perturbations anthropiques

Les activités humaines ont considérablement modifié les flux décrits ci-dessus, notamment en doublant la production de Nr à partir du N_2 à l'échelle mondiale (**Figure 1.1**). Une première source de production de Nr par les activités humaines est la fixation biologique par les cultures de plantes en symbiose avec des bactéries fixatrices du N_2 . Cette production est estimée à $\approx 50 - 70 \text{ Tg N an}^{-1}$ (Herridge *et al.*, 2008), soit à peu près équivalente à la fixation biologique dans les écosystèmes naturels terrestres. L'essentiel de l'azote de la biosphère étant présent sous forme non réactive (N_2) ou sous forme réactive mais organique, l'azote minéral disponible pour les plantes est présent en quantité limitante dans la majorité des écosystèmes (Vitousek & Howarth, 1991). La découverte puis l'industrialisation du procédé Haber-Bosch au début du XX^{ème} siècle pour la production d'ammoniac par hydrogénation de N_2 a permis la production en grandes quantités d'engrais azotés synthétiques, augmentant ainsi fortement la production agricole et permettant de soutenir la croissance démographique de la population mondiale. La production de Nr par ce procédé est actuellement estimée à $\approx 120 \text{ Tg N an}^{-1}$ (Galloway *et al.*, 2008). Le développement de l'industrie et des transports, entraînant une augmentation des réactions de combustions, a conduit à la production actuelle de $\approx 30 \text{ Tg N an}^{-1}$ d'oxydes d'azote (NO , NO_2) par oxydation de N_2 (Van Vuuren *et al.*, 2011). Les combustions relâchent $\approx 10 \text{ Tg N an}^{-1}$ supplémentaires d'oxydes d'azote n'étant pas du Nr nouvellement créé mais provenant du Nr organique présent dans les combustibles. Cependant, dans le cas de combustions d'énergies fossiles, il s'agit de Nr séquestré durablement dans les réservoirs géologiques.

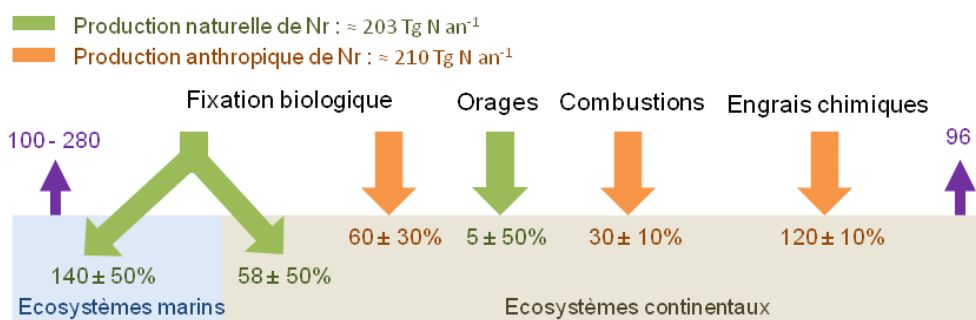


Figure 1.1. Production mondiale d'azote réactif naturelle (flèches vertes) et anthropique (flèches oranges) à partir de N_2 et libération de N_2 par dénitrification (flèches violettes) en Tg N an^{-1} . Les flèches indiquent un transfert entre réservoir atmosphérique de N_2 et écosystèmes continentaux et marins, indépendamment du devenir consécutif de l'azote. D'après Fowler et al. (2013) et Bouwman et al. (2013).

1.1.2. Azote réactif atmosphérique et processus de dépôts

Outre N_2 , l'atmosphère contient également du Nr sous forme de gaz et d'aérosols (particules solides ou liquides entre 1 nm et 100 μm de diamètre en suspension dans l'air). Actuellement, ce Nr atmosphérique provient à $\approx 33\%$ de sources naturelles soit via les processus de dénitrification (N_2O , NO), volatilisation (NH_3), incendies (NO_x) dans les écosystèmes naturels et la production de Nr à partir du N_2 de l'atmosphère par les éclairs et à $\approx 67\%$ de sources anthropiques via l'agriculture, l'industrie et les transports (**Figure 1.2**). Les oxydes d'azote produits par les combustions sont directement et en totalité émis vers l'atmosphère. L'application d'engrais azotés synthétiques sur les cultures et l'intensification des élevages augmentent la volatilisation de NH_3 vers l'atmosphère. Le transfert de l'azote réactif issu des activités humaines vers les écosystèmes naturels, soit par dépôt depuis l'atmosphère soit par lessivage dans les eaux, augmente également les émissions de Nr gazeux (NH_3 , N_2O , NO) depuis ces milieux.

Dans l'atmosphère, ces gaz peuvent intervenir dans différents processus chimiques et subir des transformations. N_2O est un gaz à fort effet de serre et contribue au réchauffement climatique. Il est non réactif dans la troposphère mais peut être détruit dans la stratosphère. Contrairement à N_2O , les NO_x (principalement NO et NO_2) et NH_3 sont très réactifs dans l'atmosphère. NH_3 peut réagir avec certains gaz acides tels que H_2SO_4 , HCl et HNO_3 (produit de l'oxydation des NO_x) pour former des aérosols. Les NO_x affectent la concentration du principal agent oxydant dans l'atmosphère (OH) et contribuent à la formation photochimique de l'ozone (O_3) troposphérique.

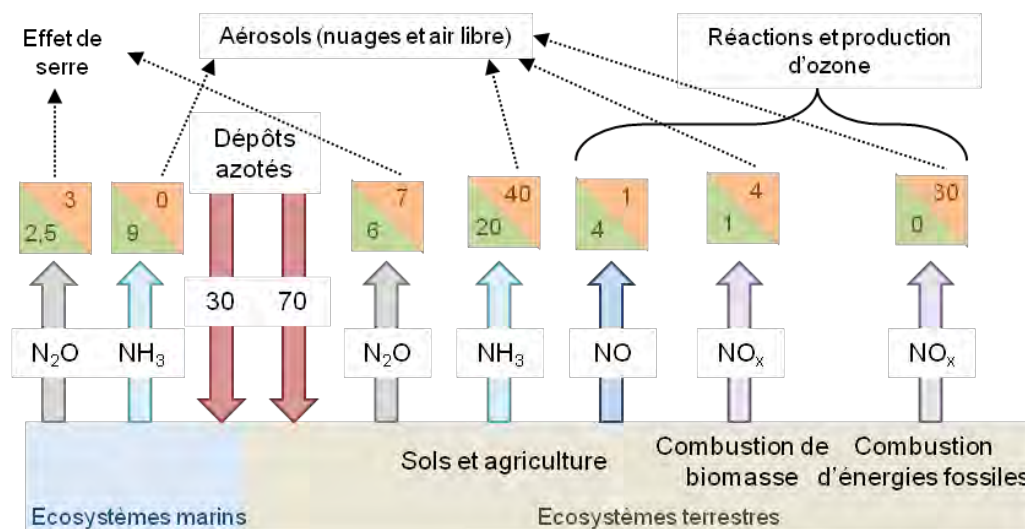


Figure 1.2. Cycle global de l'azote réactif dans l'atmosphère : principales sources, transformations, effets et produits. Les flux sont en Tg N an⁻¹. En vert les valeurs de flux d'émissions naturelles, en orange les contributions anthropiques. D'après Fowler et al. (2013).

Le Nr atmosphérique est déposé au sol après une durée de résidence moyenne d'un mois dans l'atmosphère (Fowler *et al.*, 2013), durée cependant très variable d'une forme à l'autre. Les dépôts d'azote atmosphérique ont lieu sous deux formes principales : dépôts secs et dépôts humides. Les dépôts secs ont lieu sous forme de gaz et de fines particules, les principales formes sont : HNO₃, NH₃, NO, NO₂, HONO, des composés organiques et des aérosols contenant NO₃⁻ et NH₄⁺. Il s'agit d'un processus continu et complexe, gouverné par les concentrations dans l'air des différentes formes et leur nature physico-chimique, les processus de transport turbulent dans la couche limite et la capacité de la surface à capturer et absorber les formes chimiques. Les dépôts humides font intervenir les précipitations comme vecteurs du transport des polluants vers la surface. Les gaz et particules sont soit captés par les précipitations dans la colonne d'air (on parle de « washout » et ce processus concerne 10 à 20 % du Nr dans les dépôts humides) ou bien incorporés dans les gouttelettes à l'intérieur des nuages (« rainout ») puis précipités dans la pluie ou la neige sous la forme de NO₃⁻ et NH₄⁺. Enfin, les brouillards contribuent également aux dépôts d'azote. NO₃⁻ et NH₄⁺ y sont présents dans des gouttelettes de 3 à 10 µm de diamètre qui se déposent efficacement sur la végétation. On parle de dépôts nuageux ou occultes (Hertel *et al.*, 2011).

Les dépôts atmosphériques azotés en absence d'influence anthropique sont évalués à ≈ 0,5 kg N ha⁻¹ an⁻¹ alors qu'aujourd'hui, une part importante de la planète reçoit des dépôts excédant 5 kg N ha⁻¹ an⁻¹ et que des dépôts dépassant 50 kg N ha⁻¹ an⁻¹ sont observés dans les

régions les plus polluées (Vitousek *et al.*, 1997; Galloway *et al.*, 2008). Ainsi, 90 à 99 % de l'azote actuellement déposé sur les écosystèmes est d'origine anthropique.

1.1.3. Cycle de l'azote dans les écosystèmes naturels ou semi-naturels terrestres

a - Transformations microbiennes dans le sol

Dans les écosystèmes terrestres naturels ou semi-naturels, la majeure partie du Nr est présent sous forme organique dans la biomasse et dans la matière organique morte. Seule une faible proportion est disponible sous forme inorganique dans le sol ($1-10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$; Butterbach-Bahl and Gundersen, 2011). Les sols sont le principal réservoir d'azote, contenant en moyenne $133-140 \text{ Pg N}$ ($1 \text{ Pg} = 10^{15} \text{ g}$) à l'échelle du globe (Batjes, 1996), contre environ 10 Pg N dans la biomasse végétale et environ 2 Pg N dans la biomasse microbienne (Davidson, 1994). Cependant, ce sont les processus microbiens dans le sol qui déterminent le cycle biogéochimique de l'azote (Seitzinger *et al.*, 2006).

Les microorganismes ont développé des processus métaboliques d'oxydation ou de réduction des composés azotés dont ils tirent une part de leur énergie cellulaire. La décomposition de la matière organique consiste tout d'abord en la dépolymérisation de larges polymères en monomères. Cette transformation est réalisée par des enzymes extracellulaires libérées par des bactéries et des champignons. Les monomères peuvent être immobilisés par les plantes et les microorganismes ou peuvent être dégradés par les microorganismes et libérer de l'ammonium (NH_4^+ ; ammonification). L'ammonification est un processus peu spécifique réalisé par de nombreux microorganismes hétérotrophes en conditions aérobies ou anaérobies (Jarvis *et al.*, 1996). L'ammonium peut ensuite être converti en nitrite (NO_2^- , nitrosation) puis en nitrate (NO_3^- , nitratisation) lors de la nitrification. Chacune des étapes de la nitrification est réalisée par un groupe distinct de bactéries (et d'archées pour la nitrosation) autotrophes aérobies, utilisant l'ammonium ou le nitrite comme source d'électrons pour réduire le dioxyde de carbone (Wrage *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2006). Le nitrate (et l'ammonium non nitrifié) du sol sont alors disponibles pour les plantes et les microorganismes qui les assimilent en les reconvertissant en azote organique. Le nitrate peut également être réduit en ammonium par des bactéries fermentaires en conditions anaérobies (DNRA pour Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium). La DNRA est un processus reconnu comme important dans les milieux humides

mais pourrait également être significatif dans les sols prairiaux tempérés (Müller *et al.*, 2004, 2007).

Les microorganismes hétérotrophes des sols (bactéries et champignons) assimilent l'azote sous formes organiques et inorganiques. Ils prélèvent l'ammonium, moins coûteux à assimiler que le nitrate (Recous *et al.*, 1990). Cependant, l'assimilation de nitrate par les microorganismes peut également être importante, notamment dans les sols non perturbés (Booth *et al.*, 2005; Myrold & Posavatz, 2007).

b - Prélèvement et utilisation de l'azote par les plantes

Les plantes prélèvent l'azote dans le sol sous forme inorganique (nitrate et ammonium) et, possiblement en plus faible quantité, sous forme organique (acides aminés et autres monomères) via leur système racinaire. L'intensité du prélèvement et la forme de l'azote prélevée dépendent de la quantité et de la forme de l'azote disponible dans le sol, des caractéristiques du sol, de la phénologie de la plante et du groupe fonctionnel voire de l'espèce. En effet, la coexistence d'un grand nombre d'espèces dans des milieux à ressource en azote limitée peut s'expliquer par une utilisation de formes différentes de l'azote (Chapin *et al.*, 1993; George *et al.*, 1999; McKane *et al.*, 2002; Pornon *et al.*, 2007), un prélèvement à différentes profondeurs du sol (Casper & Jackson, 1997) et à des périodes différentes (Theodose *et al.*, 1996; Hooper, 1998; McKane *et al.*, 2002; Pornon *et al.*, 2007). Par ailleurs, les plantes prélèvent majoritairement l'azote sous forme de nitrate dans les sols à pH élevé et bien oxygénés et sous forme d'ammonium dans les sols à faible pH et réducteurs, en raison de l'abondance relative des deux formes minérales (Maathuis, 2009).

L'azote prélevé par les racines est assimilé et/ou transporté vers les feuilles. Le nitrate est réduit en nitrite dans le cytoplasme par la nitrate-réductase, puis en ammonium dans les plastides par la nitrite-réductase. Ces étapes ont lieu dans les feuilles et/ou dans les racines en fonction des espèces (Gojon *et al.*, 1991). L'ammonium est assimilé en glutamine et glutamate au niveau des racines et des feuilles par la voie GS-GOGAT (Glutamine Synthétase – Glutamate Synthase). Le glutamate est un acide aminé central du métabolisme azoté des plantes vasculaires, à l'origine (avec la glutamine dans une moindre mesure) de la synthèse de la plupart des autres acides aminés par le jeu des aminotransférases.

Dans la plante, l'azote est très mobile et de nombreux échanges existent entre les compartiments. Par exemple, l'azote des organes en sénescence est en partie résorbé pour être

réalloué à d'autres organes en croissance (nouvelles feuilles, fleurs, graines...). L'azote résorbé lors de la sénescence des organes (généralement les feuilles) peut également être stocké avant d'être réalloué, lors d'une nouvelle période de croissance végétative par exemple (Millard, 1988).

c - Gains et pertes d'azote à l'échelle de l'écosystème

Les deux voies d'entrées d'azote dans les écosystèmes terrestres naturels et semi-naturels sont la fixation biologique de N_2 et les dépôts atmosphériques de Nr . La fixation biologique de N_2 , qu'elle soit réalisée par des symbioses ou des microorganismes libres dans le sol, représente des flux de l'ordre de $1,7 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ dans les forêts boréales à $36,5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ dans les plaines inondables tropicales, représentant $2,70 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ dans les prairies naturelles (Cleveland *et al.*, 1999). Avant la période industrielle, la fixation biologique de N_2 était la source majeure d'entrée d'azote dans les écosystèmes terrestres naturels et semi-naturels. Actuellement, les dépôts atmosphériques azotés représentent une source équivalente voire supérieure dans ces milieux avec des flux de l'ordre de $5 \text{ à } 50 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (Vitousek *et al.*, 1997; Galloway *et al.*, 2008).

A l'échelle de l'écosystème, des pertes d'azote ont lieu sous forme gazeuse (Nr ou N_2 émis dans l'atmosphère) ou sous forme d'azote inorganique ou organique dissous dans les eaux de lessivage. Les pertes d'azote par lessivage concernent principalement le nitrate, très mobile dans les sols. A l'inverse, l'ammonium fixé par le complexe argilo-humique des sols contribue généralement pour moins de 5% de l'azote total dissous dans la solution du sol, excepté dans les sols particulièrement chargés en ammonium (de Vries *et al.*, 2007; Dise *et al.*, 2009). Les formes d'azote organique dissous contribueraient également pour une part importante de l'azote lessivé, notamment dans les écosystèmes non, ou peu, impactés par les activités humaines (Perakis & Hedin, 2002). Lors d'incendies, la combustion de la matière organique libère dans l'atmosphère des oxydes d'azote (principalement NO et NO_2). Les processus microbiens de dénitrification libèrent également de l'azote gazeux (N_2O et N_2). Les pertes globales d'azote par dénitrification dans les écosystèmes terrestres naturels et semi-naturels sont relativement faibles en comparaison des flux de dénitrifications dans les océans ou encore sur les sols cultivés (Butterbach-Bahl *et al.*, 2011). Les pertes par dénitrification sont très variables d'un écosystème à un autre. Butterbach-Bahl *et al.* (2013) ont compilé des mesures en milieux terrestres semi-naturels allant de $0,17 \text{ à } 1,6 - 6,6 \text{ kg N-N}_2O \text{ ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ et de $0,51 \text{ à } 73,8 \text{ kg N-N}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Enfin, des pertes par volatilisation de l'ammonium (NH_4^+) en ammoniac (NH_3) peuvent également

avoir lieu. Cependant, la volatilisation intervient généralement dans le cas de fortes concentrations d'ammonium en surface du sol, conditions peu fréquentes dans les écosystèmes naturels mais répandues dans les milieux agricoles fertilisés.

1.1.4. Conséquences d'une augmentation des dépôts atmosphériques d'azote pour les écosystèmes terrestres naturels et semi-naturels

L'augmentation des dépôts azotés peut impacter les écosystèmes terrestres et leur diversité végétale à travers différents processus aux effets plus ou moins directs.

L'occurrence de concentrations très élevées dans l'air de NO, NO₂, NH₃ ou NH₄⁺ peut avoir des effets toxiques directs sur les parties aériennes des végétaux causant nécroses, modifications physiologiques et réductions de la croissance (Pearson & Stewart, 1993; Krupa, 2003). Ce risque est cependant limité pour les plantes en conditions naturelles, hormis chez certains lichens et bryophytes qui semblent particulièrement sensibles à cette toxicité (Cape *et al.*, 2009). De façon moins directe, l'augmentation des dépôts azotés peut modifier la sensibilité des plantes aux stress ou aux perturbations (sécheresse, gel, pathogènes, herbivores) à travers des modifications de leur teneur en composés secondaires et de leur vitalité (Sheppard *et al.*, 2008).

L'azote étant le principal élément limitant (ou co-limitant avec le phosphore, P) la plupart des milieux terrestres (Vitousek & Howarth, 1991; Elser *et al.*, 2007), l'enrichissement en azote d'un écosystème, ou eutrophisation, sous l'effet des dépôts azotés conduit généralement à une augmentation de la productivité et de la teneur en azote de la végétation. Sous l'effet de l'augmentation de la quantité et de la qualité de la litière, la minéralisation de l'N est favorisée, renforçant avec le temps l'augmentation de la disponibilité de l'N dans le milieu. Ce changement peut modifier les interactions biotiques interspécifiques en augmentant la compétition pour la lumière ou d'autres ressources (eau, P,... suivant les caractéristiques du milieu) et conduire à l'exclusion compétitive de certaines espèces (Smith *et al.*, 1998; Hautier *et al.*, 2009).

Enfin, les dépôts azotés peuvent avoir un effet acidifiant sur les sols. En effet, la nitrification et le prélèvement racinaire de NH₄⁺ conduisent à la libération de protons (H⁺) dans le sol. Les H⁺ libérés démobilisent les cations basiques qui peuvent ensuite être entraînés par lessivage, contribuant à la diminution du pouvoir tampon des sols et favorisant leur acidification (Marschner *et al.*, 1991; Horswill *et al.*, 2008). L'acidification du sol réduit la nitrification et le prélèvement par les plantes, favorisant une accumulation du NH₄⁺ (Roelofs *et al.*, 1985). La diminution du pH peut également entraîner la libération de métaux présents dans les sols, et notamment l'aluminium réactif (Alⁿ⁺). L'accumulation de NH₄⁺, Alⁿ⁺ et autres métaux (Fe,

Mn...) a des effets toxiques sur les plantes. Aussi, les divers changements dans les sols accompagnant leur acidification peuvent conduire à une perte d'espèces (Bowman *et al.*, 2008).

La réponse des espèces ou des communautés à ces processus dépend fortement de la durée d'exposition, de la quantité et de la forme physico-chimique de l'azote déposé, de la sensibilité intrinsèque de la (ou des) espèce(s), des conditions abiotiques locales (climat, caractéristiques du sol) et des pratiques de gestions (passées et présentes). Ainsi, différents écosystèmes et communautés n'auront pas la même sensibilité aux dépôts azotés. Afin de quantifier cette sensibilité et de l'intégrer dans les politiques de conservation de la biodiversité et de limitation des émissions de polluants, le concept de charge critique a été développé. La charge critique est définie comme une estimation quantitative de l'exposition à un ou plusieurs polluants au-dessous de laquelle aucun effet nuisible sur des éléments sensibles de l'environnement n'est observé, dans l'état actuel des connaissances (Nilsson, 1988). Les charges critiques sont actuellement définies à 5 – 10 kg N ha⁻¹ an⁻¹ pour les milieux les plus sensibles (toundra, forêts boréales, pelouses alpines et subalpines, communautés de mousses et lichens des sommets, tourbières) et à 30 – 40 kg N ha⁻¹ an⁻¹ pour les milieux les moins sensibles (marais pionniers et à faible ou moyenne salinité ; Bobbink *et al.*, 2010).

Ainsi, à l'échelle mondiale, les dépôts azotés devraient être la troisième cause de perte de biodiversité d'ici 2100 après les changements d'usage des terres et le changement climatique. A l'échelle des écosystèmes alpins, il s'agirait de la deuxième cause, juste derrière le changement climatique (Sala *et al.*, 2000).

1.2. Dépôts atmosphériques azotés et pelouses subalpines

1.2.1. Présentation et particularités des pelouses subalpines

La définition de l'étage subalpin peut varier d'un auteur à l'autre. Ici, nous considérons qu'il s'étend de la limite supérieure de la forêt continue à la limite supérieure de répartition des arbres (pins à crochets) et arbustes (rhododendrons, genévriers, callunes, myrtilles...). L'étage subalpin est donc une zone de transition, caractérisée par une mosaïque de pelouses, de landes arbustives et d'îlots de pins à crochets. Les pelouses sont des formations végétales herbacées de hauteur limitée, dominées par des Poacées. Les pelouses subalpines sont essentiellement composées de graminoides (Poacées, Cypéracées, Joncacées...) souvent en touffes denses,

d'herbacées pérennes (souvent en rosettes), de géophytes et de végétaux non vasculaires (mousses et lichens), avec parfois la présence de quelques petits arbustes et plantes en coussins.

Les milieux subalpins, bien que dans une moindre mesure que les habitats des étages supérieurs (alpin et nival), sont associés à des caractéristiques climatiques particulières du fait de leur altitude : augmentation du flux de radiation solaire, de la fraction d'UV et de la fréquence de couverture nuageuse, et réduction de la durée de la saison de végétation (en climat tempéré). Le relief (pente et exposition) et la microtopographie influencent fortement les conditions climatiques et édaphiques locales (durée d'enneigement, ensoleillement, vent...), conférant à la végétation un agencement en mosaïque d'habitats et de communautés.

Les sols subalpins sont riches en matière organique mais pauvres en nutriments en raison des faibles températures qui limitent les processus biologiques. Ceci est particulièrement vrai pour l'azote dont la disponibilité dépend presque uniquement (hors contexte de dépôts d'origine anthropique) de processus biologiques (fixation de N_2 et minéralisation). Aussi, l'azote est très souvent le nutriment limitant la productivité des plantes dans ces milieux (Körner, 1999). Par ailleurs, l'accumulation de matière organique d'origine végétale dans ces sols froids est à l'origine d'un processus d'acidification prononcé (Körner, 1999). Aussi, il est fréquent d'observer dans ces milieux des sols aux pH particulièrement faibles.

1.2.2. Problématique

Les pelouses subalpines, écosystèmes oligotrophes et acidiphiles, sont potentiellement très sensibles aux dépôts azotés, soit par acidification (du fait du pH déjà très bas et du faible pouvoir tampon des sols ; Moncoulon et al., 2004) soit par eutrophisation (Clark *et al.*, 2007). De tels impacts sont susceptibles de réduire leur biodiversité. En effet, de nombreuses espèces caractéristiques de ces milieux ont développé des stratégies de tolérance à une faible disponibilité en azote et sont donc potentiellement menacées d'exclusion par des espèces plus compétitrices en cas d'augmentation de la disponibilité en cet élément (Grime, 1977). Par ailleurs, les espèces rares sont généralement les premières menacées par l'augmentation des dépôts azotés du fait de leur amplitude écologique réduite et d'une sensibilité accrue aux concentrations élevées de NH_4^+ (Clark & Tilman, 2008; Kleijn *et al.*, 2008).

En Europe, les écosystèmes d'altitude sont en moyenne plus éloignés des principales sources anthropiques d'azote atmosphérique que la plupart des écosystèmes semi-naturels de plaine (rarement très éloignés de zones urbaines ou agricoles). Ainsi, ils sont moins exposés aux dépôts azotés que les forêts, landes et prairies de basse altitude, notamment dans le Nord Ouest

de l'Europe (Royaume-Uni, Pays-Bas, Allemagne...). L'urgence d'étudier les impacts environnementaux dans les zones les plus touchées explique en partie le nombre relativement faible de travaux portant sur les dépôts azotés dans les milieux d'altitude. Cependant, les dépôts atmosphériques actuels peuvent représenter une source d'azote assimilable quantitativement importante dans ces milieux où les taux de fixation biologique et de recyclage de l'azote organique sont réduits. D'autant que les phénomènes d'accroissement orographique des précipitations et d'effets « seeder-feeder » (un nuage bas chargé en polluants, « feeder », est lessivé par les précipitations d'un nuage haut, « seeder ») peuvent contribuer à augmenter les quantités de dépôts humides en zones de montagne (Hertel *et al.*, 2011). Enfin, des études récentes ont souligné l'importance de l'accumulation à long-terme des dépôts chroniques de faible intensité et la sensibilité accrue des écosystèmes recevant ces faibles quantités de dépôts à la perte de diversité (Clark & Tilman, 2008; Stevens *et al.*, 2010).

1.2.3. Objectifs de la thèse

Les pelouses subalpines sont des milieux *a priori* sensibles, *i.e.* susceptibles de répondre à une augmentation des dépôts azotés par des changements importants de fonctionnement de l'écosystème et potentiellement une perte de diversité. Elles ont été peu étudiées dans ce contexte, comparativement aux nombreuses études ayant porté sur le changement climatique. Ces dernières ayant montré des effets importants du changement climatique, nous avons appréhendé la réponse des pelouses subalpines aux dépôts azotés dans un contexte de changement climatique. Cette thèse a pour objectif principal de caractériser et de quantifier la vulnérabilité (*i.e.* les dépôts azotés auxquels le milieu est exposé) et la sensibilité aux dépôts atmosphériques azotés de ces milieux. Dans ce cadre, les questions de recherche abordées sont les suivantes :

Quels sont les niveaux actuels de dépôts azotés sur ces milieux? Est-il possible de développer une méthode de biosurveillance de ces dépôts à l'échelle d'un massif ?

Ces questions sont abordées dans le Chapitre 2 à travers deux articles en anglais. Le premier présente les résultats d'une année de mesure des dépôts azotés sur 8 sites subalpins des Pyrénées et leur comparaison avec les estimations fournies par les deux modèles de chimie-transport les plus fréquemment utilisés en Europe (EMEP et CHIMERE). Le second article présente un essai de calibration d'une méthode de biosurveillance basée sur la teneur en azote de lichens de ces 8 sites.

Comment changent la diversité et la composition des communautés végétales des pelouses subalpines le long de gradients climatiques et d'augmentation du cumul de dépôts azotés ? Des changements dans ces communautés ont-ils eu lieu ces dernières décennies ? Ces changements, s'ils existent, sont-ils une réponse à l'augmentation du cumul de dépôts azotés et/ou à d'autres facteurs tels que les changements climatiques ?

Ces questions sont abordées dans le troisième chapitre à travers un troisième article en anglais. Dans ce travail nous combinons deux approches basées sur l'étude de relevés floristiques couvrant le massif pyrénéen au cours des 60 dernières années : une approche par l'étude de 553 communautés réparties le long de gradients environnementaux d'origines spatiale et temporelle et une approche temporelle basée sur le ré-échantillonnage de 40 relevés historiques.

Dans quels compartiments de l'écosystème (biomasse aérienne, racines, sol) se retrouve l'azote réactif provenant de l'atmosphère et dans quelles proportions ? Quelles sont les différences de prélèvement, de conservation et d'utilisation de cet azote entre les différentes espèces ? Quels sont les effets de la quantité et de la forme (NO_3^- vs NH_4^+) de cet azote sur l'écosystème (de la chimie du sol et des tissus végétaux à la structure et la composition de la communauté) ? Existe-t-il des interactions avec le changement climatique ?

Ces questions sont l'objet du quatrième chapitre. Nous tenterons d'y répondre à travers une expérimentation *in situ* d'apports d'azote par pulvérisations à des doses réalistes en comparaison aux dépôts reçus par ces milieux et de simulation du changement climatique, couplée au traçage isotopique de l'azote apporté.

1.2.4. **Modèle d'étude** : les nardaies subalpines pyrénéennes

Du fait de leur position biogéographique (domaines atlantique et méditerranéen) et de leur proximité avec des zones refuges durant les épisodes pléniglaciaires du quaternaire, les Pyrénées sont particulièrement riches en espèces (4500 espèces végétales recensées dont 180 endémiques). Les pelouses occupent de vastes surfaces dans le paysage subalpin pyrénéen. Leur origine et leur maintien proviennent à la fois des conditions climatiques particulières à cette altitude et de la gestion de ces milieux par l'homme (défrichage, notamment pour la production de charbon, et pastoralisme). Ce sont aujourd'hui des habitats semi-naturels à fort intérêt patrimonial.

Parmi ces pelouses, les nardaies sont dominées ou co-dominées par la Poacée *Nardus stricta* L. (Nard). Elles sont rattachées à l'alliance du *Nardion strictae* Br.-Bl. 1926. Leur

végétation est assez basse (souvent < 20 cm), relativement dense et fermée (recouvrement généralement proche des 100%). Bien que parfois localement relativement pauvres du point de vue floristique, elles constituent un ensemble diversifié de communautés et sont une composante paysagère majeure de l'étage subalpin pyrénéen sur substrats siliceux ou décalcifiés (**Figure 1.3**), justifiant leur classement en habitat prioritaire de la directive Natura2000 « Habitats – Faune – Flore » (habitat 6230). Malgré une valeur pastorale relativement faible (notamment en raison de la faible qualité fourragère du Nard), elles constituent la majeure partie des pâturages d'altitude dans les Pyrénées du fait de l'importance des surfaces qu'elles occupent. Leur répartition altitudinale est centrée entre 1500 et 2500 m, mais peut s'étendre de 1300 à 2800 m en fonction des conditions locales. Elles sont relativement proches floristiquement des communautés du *Violion caninae* Schwick. 1944, une alliance présente en plaine et bien étudiée en Europe dans le contexte des dépôts atmosphériques azotés (Stevens *et al.*, 2004, 2010, 2011; Duprè *et al.*, 2010; Gaudnik *et al.*, 2011).



Figure 1.3. Illustration de la diversité de situations des nardaies pyrénéennes. En haut à gauche : plateau de Beille ; en haut à droite : vallon du Galbe ; en bas à gauche : cirque d'Espingo ; en bas à droite : au-dessus de l'étang du Laurenti.

Chapitre 2

Dépôts atmosphériques azotés à l'étage subalpin dans les Pyrénées

2.1. Mesure des dépôts atmosphériques azotés et confrontation aux modèles de chimie-transport

2.1.1. Contexte et résumé

Les émissions d'azote réactif d'origine anthropique ont modifié la composition de notre atmosphère, avec différentes répercussions allant de la santé humaine aux impacts environnementaux (Galloway *et al.*, 2008). Même de faibles niveaux de dépôts azotés peuvent conduire sur le long-terme à des impacts sur les communautés végétales (Clark & Tilman, 2008; Stevens *et al.*, 2010; Phoenix *et al.*, 2012; Payne *et al.*, 2013). De nombreux points chauds de biodiversité et zones prioritaires pour la conservation sont ainsi potentiellement menacés par ces dépôts chroniques (Phoenix *et al.*, 2006). Caractériser cette menace requiert des estimations spatialisées fiables et relativement précises de la quantité et de la forme des dépôts azotés. Suite à la création de la convention sur la pollution de l'air transfrontalière à longue distance (CLRTAP) en 1979, des outils de modélisation du transport et des dépôts des polluants atmosphériques ont été développés, dont les modèles de chimie-transport EMEP (Simpson *et al.*, 2012) et CHIMERE (Menut *et al.*, 2013). Ces modèles sont validés grâce à des réseaux de stations de mesure. Cependant, en raison de leur isolement, les régions montagneuses sont généralement exclues de ces réseaux et les mesures locales, même à court terme, y restent rares (Lovett & Kinsman, 1990).

Nous avons mesuré les dépôts azotés durant une année sur huit sites de l'étage subalpin des Pyrénées (entre 1500 et 2000 m d'altitude) et avons confronté ces observations aux estimations des modèles EMEP et CHIMERE. Nos mesures révèlent des dépôts azotés compris entre 8 et 15 kg N ha⁻¹ an⁻¹, dominés par les dépôts d'azote oxydé, et des concentrations dans l'air comprises entre 0,50 et 1,32 µg N-NH₃ m⁻³ et 0,29 et 1,02 µg N-NO₂ m⁻³ (en période estivale). Les concentrations dans l'air en NH₃ et NO₂ sont très proches, voire légèrement inférieures aux valeurs prédites par les modèles. En revanche, les mesures rapportent des dépôts azotés plus importants qu'estimé par les modèles : de 295 mg N m⁻² an⁻¹ en moyenne pour EMEP et de 763 mg N m⁻² an⁻¹ en moyenne pour CHIMERE. Notamment, les dépôts d'azote oxydé mesurés correspondent à 2,6 fois ceux estimés par EMEP et 3,6 fois ceux estimés par CHIMERE.

L'estimation des dépôts azotés, que ce soit par modélisation ou par des mesures *in situ*, est relativement complexe, particulièrement en montagne. En effet, les modèles à grande échelle

tels qu'EMEP et CHIMERE ne peuvent que difficilement intégrer les variabilités topographiques et climatiques des zones de montagne. En termes de mesures, les dispositifs et protocoles de mesures développés dans les réseaux européens sont difficilement transposables aux contraintes du terrain en montagne. Cette étude ne remet pas en cause la qualité générale et l'utilité des modèles, mais souligne l'intérêt de réaliser des mesures, même ponctuelles, dans les zones dépourvues de stations de mesure et de les confronter aux estimations provenant de ces modèles.

Les dépôts azotés mesurés sur ces huit sites sont de l'ordre de, ou excèdent, la charge critique actuellement admise pour les pelouses subalpines ($5 - 10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$; Bobbink *et al.*, 2010). Les pelouses subalpines pyrénéennes sont donc susceptibles de subir, ou d'avoir subi, une eutrophisation et/ou une acidification ainsi qu'une perte de biodiversité, effets généralement observés en réponse à des dépôts azotés excédant la charge critique du milieu.

2.1.2. Article: **Subalpine Pyrenees received higher nitrogen deposition than predicted by EMEP and CHIMERE chemistry-transport models**

Marion Boutin^{1,2}, Thierry Lamaze², Florian Couvidat³ and André Pornon¹.

¹Université Toulouse 3 Paul Sabatier, CNRS, ENFA, UMR5174 Laboratoire Evolution & Diversité Biologique, 118 route de Narbonne F-31062 Toulouse, France

²Centre d'Etudes Spatiales de la BIOSphère, F-31401 Toulouse, France

³INERIS, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

Correspondence to: marionboutin@free.fr

Published in *Scientific Reports*: DOI: 10.1038/srep12942

Abstract

Deposition of reactive nitrogen (N) from the atmosphere is expected to be the third greatest driver of biodiversity loss by the year 2100. Chemistry-transport models are essential tools to estimate spatially explicit N deposition but the reliability of their predictions remained to be validated in mountains. We measured N deposition and air concentration over the subalpine Pyrenees. N deposition was found to range from 797 to 1,463 mg N m⁻² year⁻¹. These values were higher than expected from model predictions, especially for nitrate, which exceeded the estimations of EMEP by a factor of 2.6 and CHIMERE by 3.6. Our observations also displayed a reversed reduced-to-oxidized ratio in N deposition compared with model predictions. The results highlight that the subalpine Pyrenees are exposed to higher levels of N deposition than expected according to standard predictions and that these levels exceed currently recognized critical loads for most high-elevation habitats. Our study reveals a need to improve the evaluation of N deposition in mountains which are home to a substantial and original part of the world's biodiversity.

Introduction

Half the reactive nitrogen (N) produced annually on earth results from anthropogenic activities (Fowler *et al.*, 2013). For decades, anthropogenic N emissions have deeply altered the composition of the earth's atmosphere and atmospheric deposition, with diverse human and environmental repercussions (Galloway *et al.*, 2008). It is thought that by the year 2100 atmospheric nitrogen deposition will be the third greatest driver of biodiversity loss (Sala *et al.*, 2000). Recent studies have stressed that long-term chronic enhancement of N deposition may have a detrimental effect on plant communities even at low levels (Clark & Tilman, 2008; Stevens *et al.*, 2010; Phoenix *et al.*, 2012; Payne *et al.*, 2013). Therefore, many biodiversity hot-spots and priority conservation areas on the planet are potentially threatened by chronic, long-range N pollution (Phoenix *et al.*, 2006). To assess this threat and orientate conservation policies, reliable spatially explicit estimations of the amounts and forms of atmospheric N deposition are crucially needed.

Impelled by the creation of the Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution (CLRTAP) in 1979, modelling tools were developed to simulate pollutant transport and deposition over Europe. Among them, the eulerian chemistry-transport models EMEP (European Monitoring and Evaluation Programme; Simpson *et al.*, 2012) and CHIMERE (Menut *et al.*,

2013) were developed to simulate air quality at a regional scale. Those model can also be used to simulate spatio-temporal N deposition and are currently used to assess the impacts of N deposition on plant communities along large spatial (Stevens *et al.*, 2010) and temporal gradients (Duprè *et al.*, 2010), and also to estimate exceedances of N critical loads (García-Gómez *et al.*, 2014). However, despite the constant improvement of model parameterizations and the quality of input data, simulations still suffer from the lack of and the uneven distribution of measurement stations (Hjellbrekke & Fjaeraa, 2013). Although modelled data have been validated in several well monitored regions (Simpson *et al.*, 2006), a lack of reliability of deposition estimates is still to be suspected in regions distant from any measurement stations, especially with complex orography and meteorology. Mountain regions typically cumulate both these characteristics. Moreover, remote high-elevation sites are rarely included in large measurement networks and studies involving local and punctual measurements at mountain sites are scarce (Lovett & Kinsman, 1990). Preservation of high elevation habitats is a priority both in terms of biodiversity conservation and water quality insurance. Therefore it is of primary importance to collect complementary N deposition data in mountains and to compare them with chemistry-transport simulations for these regions.

We equipped eight sites above the treeline (between 1,500 and 2,000 m a.s.l.) in the Pyrenees along a 100 km geographical transect (see Supplementary Fig. S1). At each site, we measured bulk N (NO_3^- and NH_4^+) deposition and air gaseous NO_2 and NH_3 concentrations during the growing season from June to October and bulk N deposition in snow during winter from November to May. Then we compared our observations with the values from the 2012 – 2013 years for the two models.

Results

Table 2.1. Measured N air concentration and bulk deposition. Average NH_3 and NO_2 air concentrations ($\mu\text{g N m}^{-3}$), rain, snow and rain + snow cumulated NH_4^+ and NO_3^- bulk deposition ($\text{mg N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$) measured at the eight sites. n.a. These observations were excluded because the sampling devices were not exposed for the same period of time.

Site	Air concentration ($\mu\text{g N m}^{-3}$)		Rain bulk deposition ($\text{mg N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$)		Snow bulk deposition ($\text{mg N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$)		Rain + snow bulk deposition ($\text{mg N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$)	
	NH_3	NO_2	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-
<i>Bei</i>	0.58	0.37	125	339	142	191	267	530
<i>Guz</i>	0.79	0.35	204	373	321	323	526	696
<i>Mou</i>	0.50	0.29	161	291	298	665	459	956
<i>Olm</i>	0.57	0.38	160	340	249	335	409	675
<i>Pai</i>	0.86	0.27	180	296	286	367	466	663
<i>Puy</i>	1.32	1.02	174	364	558	367	732	731
<i>Sou</i>	0.60	0.78	159	497	330	189	489	685
<i>Sup</i>	0.81	0.39	175	355	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Measured NO_3^- deposition ($705 \pm 128 \text{ mg N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$; mean \pm sd; **Table 2.1**) was on average 2.6-fold higher than EMEP values (paired Wilcoxon-rank-sum-test, $n = 7$, $P = 0.016$; **Figure 2.1**) and 3.6-fold higher than CHIMERE values ($n = 7$, $P = 0.016$; **Figure 2.1**). Measured NH_4^+ deposition ($478 \pm 139 \text{ mg N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$; **Table 2.1**) was significantly 1.5-fold lower than from EMEP data ($n = 7$, $P = 0.047$; **Figure 2.1**) but was on average 2.4-fold higher than from CHIMERE values ($n = 7$, $P = 0.016$; **Figure 2.1**).

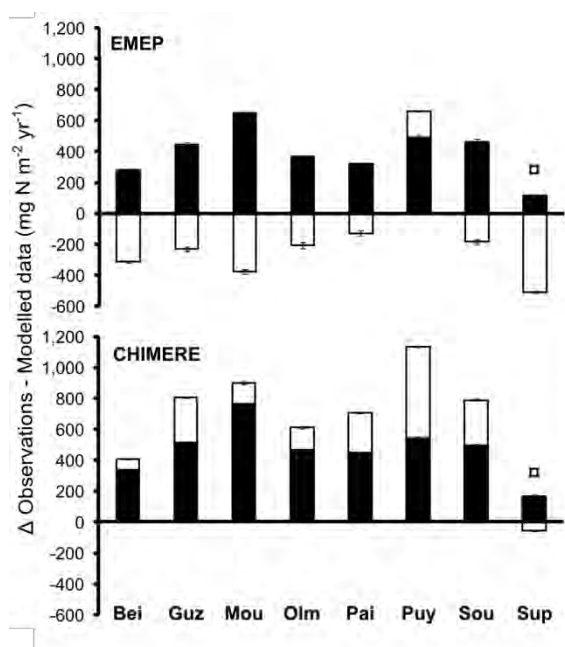


Figure 2.1. Discrepancy between N deposition observations and modelled data. Difference between bulk measurements (rain + snow) and EMEP (upper panel) or CHIMERE (lower panel) total (wet + dry) modelled values for reduced N (white) and oxidized N (black). Mean of the difference between observations and each year of the modelled values, the error bars represent the value of each year individually. \square The Sup site observations only take into account bulk rain measurements (June-October).

These results are supported by the relatively high error metrics, especially for NO_3^- (Mean Normalized Bias of -60% for EMEP and -71% for CHIMERE; **Table 2.2**). Overall, observed $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ deposition was higher than EMEP simulations by $295 \text{ mg N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$ on average ($n = 7$, $P = 0.031$) and higher than CHIMERE simulations by $763 \text{ mg N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$ on average ($n = 7$, $P = 0.016$; **Figure 2.1**). Finally, as a notable consequence of the strong discrepancy between observed and modelled values for nitrate (oxidized N) deposition, ratios of reduced to oxidized N exceeded 1 (2.5 ± 0.5 for EMEP and 1.15 ± 0.3 for CHIMERE) when calculated from modelled data while they were below 1 (0.7 ± 0.4) when calculated from observation (**Figure 2.2**).

Table 2.2. Error metrics for the comparison of measured and modelled N concentration and deposition. Mean normalized absolute error (MNAE) and Mean normalized bias (MNB) for the comparison of observed and EMEP and CHIMERE values for gaseous N concentrations (NH_3 and NO_2); and for the observed bulk deposition (NH_4^+ and NO_3^- in rain + snow) with EMEP and CHIMERE modelled values for N deposition (wet + dry). Values are mean (\pm sd) for the 2 years of modelled data.

	MNAE	MNB
EMEP		
NH_3	69% (\pm 5%)	60% (\pm 7%)
NO_2	88% (\pm 1%)	72% (\pm 1%)
NH_4^+	55% (\pm 2%)	48% (\pm 2%)
NO_3^-	60% (\pm 2%)	-60% (\pm 2%)
CHIMERE		
NH_3	50% (\pm 1%)	16% (\pm 5%)
NO_2	48% (\pm 1%)	-17% (\pm 0%)
NH_4^+	49% (\pm 0%)	-49% (\pm 0%)
NO_3^-	71% (\pm 1%)	-71% (\pm 1%)

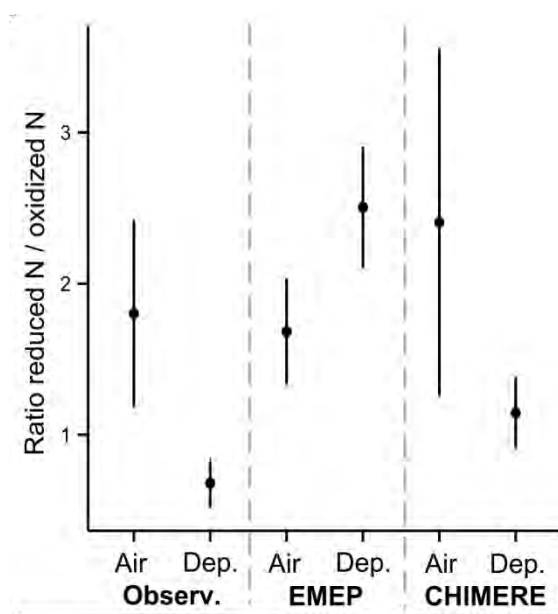


Figure 2.2. Reduced-to-oxidized ratios in air and deposition. Mean ratio (reduced / oxidized N forms) in air and in total deposition (Dep.). The error bars represent 95% confidence intervals.

Average measured NO_2 concentration in air ($0.48 \mu\text{g N m}^{-3} \pm 0.27$; **Table 2.1**) was not significantly different from EMEP ($n = 8$, $P = 0.207$; **Figure 2.3**) nor from CHIMERE predictions ($n = 8$, $P = 0.233$; **Figure 2.3**), and measured NH_3 air concentration ($0.75 \mu\text{g N m}^{-3} \pm 0.26$; **Table 2.1**) was significantly lower than from EMEP ($n = 8$, $P = 0.039$; **Figure 2.3**) and not significantly different from CHIMERE data ($n = 8$, $P = 0.641$; **Figure 2.3**). Error metrics were relatively high (**Table 2.2**), because the magnitude of the difference between modelled and

observed concentrations was high relative to the low concentrations observed or expected. In contrast to deposition, observed ratios of reduced to oxidized N air concentrations (1.8 ± 0.3) and modelled ratios (1.68 ± 0.42 for EMEP and 2.72 ± 1.32 for CHIMERE) were greater than 1, indicating higher concentrations of NH_3 than of NO_2 in air (**Figure 2.2**).

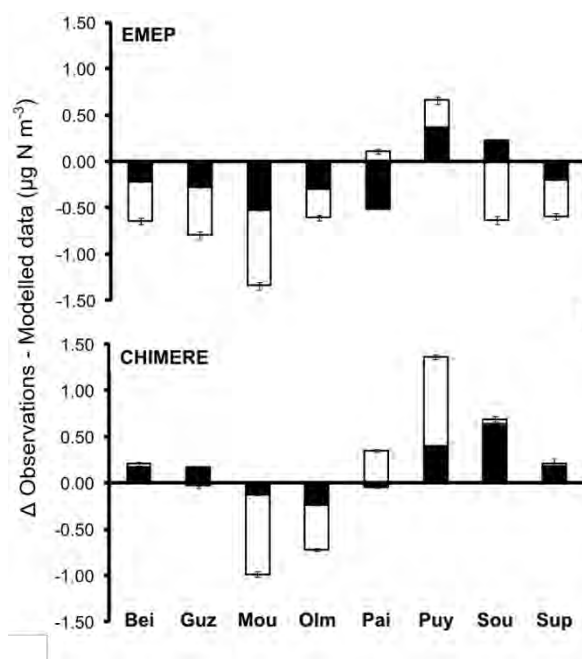


Figure 2.3. Discrepancy between N air concentration observations and modelled data. Difference between passive gas sampler measurements and EMEP (upper panel) or CHIMERE (lower panel) modelled values for NH_3 (white) and NO_2 (black) air concentrations. Mean of the difference between observation and each year of the modelled values, the error bars represent the value of each year individually.

Discussion

N deposition was evaluated with a conventional resin-based bulk deposition method. The winter devices might have collected both wet and dry deposition over the snow pack during the period they were fully covered with snow. The summer devices collected wet deposition but only part of the dry deposition since the surface of the collectors was not entirely representative of the rough exchange surface of vegetation which allows plants to catch N from aerosols, gaseous and occult (fog) deposition (Dämmgen *et al.*, 2005). Therefore, the deposition measured in this study could be closer to total deposition (wet + dry) than to wet deposition, but cannot be actually considered as total deposition. Since we compared these observed deposition values with the total (wet + dry) deposition values from the models, the approximations made here should have led to the observed values being lower than the modelled ones, not consistently higher as noted

in the present work. Thus, the underestimation made by the simulations could thus even be greater than observed here. Especially, fog water has been shown to be more concentrated in N ions than precipitation and to make a large contribution to total N deposition at high elevation (Baumgardner *et al.*, 2003; Zapletal *et al.*, 2007) but is difficult to simulate in modelling (Gultepe *et al.*, 2007). The difference between N compounds included in modelled total deposition and in measured bulk deposition may on the other hand explain part of the difference observed in the ratios of reduced to oxidized N. Especially, oxidized N deposition can be composed of a large variety of compounds (NO_x , HNO_3 in gas and particulates, HONO, PAN organic molecules, organonitrate...).

Few measurements of N deposition in European high-elevation open areas are available. Recent studies in different regions of the Alps found levels of deposition in a range similar to those observed in this study (between 500 and 1,360 $\text{mg N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$; Balestrini *et al.*, 2000; Kirchner *et al.*, 2014). Measurements of bulk deposition by sampling water from rain and snow events on four sites in the Spanish Pyrenees in 1987-1988 led to estimations of N deposition between 391 and 1,041 $\text{mg N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$ (Camarero & Catalan, 1993). In the Swiss Alps, NH_3 concentrations ranging from 0.5 to 1.1 $\mu\text{g N m}^{-3}$ have been observed between April and September at elevations ranging from 1,070 to 1,914 m (Thöni *et al.*, 2004); and in the Austrian Alps, NH_3 concentrations ranging from 0.2 to 2.5 $\mu\text{g N m}^{-3}$ (0.7 $\mu\text{g N m}^{-3}$ on average) have been observed over a year between 930 and 1,758 m of elevation (Löflund *et al.*, 2002). These results stress that the values of N deposition or concentration observed in the present study are not unusual in high-elevation areas of Europe. However, the differences observed between the studies could result from both the methods used for the measurements, specific climatic conditions and different chemical origins and pathways for each region.

By comparing our measurements with estimations made by EMEP and CHIMERE, we found consistently higher values of N deposition (and more particularly of oxidized N) than predicted by these chemistry-transport models.

Part of the discrepancy between observation and modelled data could be suspected to come from incommensurability, *i.e.* the difference between spatial representations of measurements and simulations (Swall & Foley, 2009): simulations tend to provide averaged values representative of a relatively vast area (2500 km^2 in the case of EMEP, 49 km^2 for CHIMERE), whereas measurements are conducted at a very local scale and cannot be reasonably considered as representative of large areas, especially in such heterogeneous topography as mountain landscapes.

In the study region, precipitation amounts during the measurements period (from June 2012 to May 2013) were similar to average precipitation received over the two calendar years 2012 and 2013. The difference was of only 66 mm more in June 2012 – May 2013 than the average precipitation amount over 2012 – 2013. However, it was of 402 mm more than in 2012 and 269 mm less than in 2013 (see Supplementary Table S2).

Finally, we did not find an underestimation of gaseous N concentration in the air. On the contrary, observed values tended to be lower than expected from the models, especially in the case of NH_3 . Lower values might come from slightly less efficient sampling by the passive samplers in field conditions (low concentrations of the targeted gases) compared with the lab conditions they were tested in. Moreover, we did not measure N aerosol and other gaseous oxidized N species concentrations (among which HNO_3 is expected to be an important contributor to deposition). Thus, an underprediction of the concentration of these aerosols or other gases in the atmosphere by the models might still account for the discrepancy between modelled vs. measured deposition.

Studies comparing EMEP and CHIMERE predictions with measured N deposition found that these models performed rather well in low elevation regions. Indeed, in north-western Europe, EMEP globally underpredicted N deposition by only 10% when compared with the ICP-forests and EMEP/CCC measurement networks (Simpson *et al.*, 2006). In Spain, models slightly underestimated N deposition when compared with the ICP-forests and Catalan Air Quality networks (García-Gómez *et al.*, 2014), but in this study bulk deposition measurements were compared with model predictions for wet only (and not wet + dry) deposition, which may explain the discrepancy. Therefore, the underestimation observed in our study might be specific to the high elevation nature of this area.

Because a thorough evaluation of precipitation is crucial to accurately model deposition amounts (Simpson *et al.*, 2006), the underestimation of deposition observed here could result from an underestimation of precipitation amounts by the models. However, on average from 2009 to 2012, EMEP and CHIMERE underestimated precipitation amounts only by a factor of 0.95 and 0.76 respectively in our study area (see Supplementary Table S2). The cause of the discrepancy in N deposition could thus be rather the particularity of deposition events at high elevation, especially snow and occult deposition. Indeed, as EMEP and CHIMERE models are not specific to mountain regions, they might lack input data and parameters to correctly simulate snow and occult deposition which represent a large part of total N deposition at high elevation (Körner, 1999; Baumgardner *et al.*, 2003; Zapletal *et al.*, 2007). In that case, the discrepancy between

model predictions and measurements observed in the Pyrenees might occur in other mountain regions.

Finally, it cannot be excluded that the discrepancy might come from an underestimation in the N emissions data used in these models.

Our findings suggest that the subalpine zone of the Pyrenees could be more seriously threatened by N deposition than predicted by EMEP and CHIMERE simulations. Indeed, while the currently recognized critical loads for N in subalpine grasslands are 500-1,000 mg N m⁻² year⁻¹ (Bobbink *et al.*, 2010), all 8 sites studied here received a N load of over 500 mg N m⁻² year⁻¹ and 6 of them received more than 1,000 mg N m⁻² year⁻¹ (**Table 2.1**). According to EMEP data, 8 sites were predicted to receive a N load of over 500 mg N m⁻² year⁻¹ but only one or two sites (in 2012 or 2013 respectively) were predicted to receive a N load of over 1,000 mg N m⁻² year⁻¹ (see Supplementary Table S1). According to CHIMERE, none or 1 site (in 2012 or 2013 respectively) was predicted to receive a N load of over 500 mg N m⁻² year⁻¹, and no sites were predicted to receive a N load of over 1,000 mg N m⁻² year⁻¹ (see Supplementary Table S1). N availability in high-elevation soils is considered low because of slow N mineralization rates, substantial N competition between microbes and plants, and considerable plant N re-allocation (Körner, 1999). Such abundant N deposition in these habitats could thus considerably increase N availability and lead to eutrophication. Deposition of reduced N on soils with low buffer capacity can lead to acidification via the processes of nitrification and root uptake which both release H⁺ ions; then soil acidification and leaching of nitrates (from deposition of oxidized N or from nitrification) can cause base cation depletion (Marschner *et al.*, 1991; Horswill *et al.*, 2008). By underestimating NH₄⁺ deposition, the CHIMERE model could thus also underestimate the risk of soil acidification. Eutrophication and acidification are the main pathways to N deposition mediated biodiversity loss (Bobbink *et al.*, 2010). Many characteristic high-elevation species are typically adapted to nutrient-poor conditions and have a limited ability to respond to an increase in N availability (Lamaze *et al.*, 2003; Marty *et al.*, 2009). Therefore, subalpine biodiversity could be especially at risk as many characteristic species could be outcompeted as a consequence of eutrophication (Hautier *et al.*, 2009) and because these soils usually have a low buffer capacity (Körner, 1999).

Our findings also report reversed reduced to oxidized ratios in N deposition in high-elevation Pyrenees compared with those predicted from EMEP or CHIMERE. A misestimation of the ratio between N forms in deposition might lead to wrong predictions of the effects on plant communities as their composition depends on the partitioning of differently available forms of N

(McKane *et al.*, 2002). In subalpine grasslands, plants preferentially use NH_4^+ (the dominant form of N in these soils), but some species, especially certain grasses, are more able to use NO_3^- than others (for instance certain shrubs ; Pornon *et al.*, 2007). Overall, such species could thus be more able to take advantage of an additional input of NO_3^- and outcompete less competitive species. Furthermore, as about half of the NO_3^- deposition occurs from snow (**Table 2.1**), when vegetation uptake is low, and because NO_3^- is highly soluble, high levels of NO_3^- deposition could be a threat to stream and lake water quality (Curtis *et al.*, 2005; Bergstrom & Jansson, 2006). Such potential environmental impacts could thus be missed if only these simulations are taken as reference.

This study does not aim to challenge the high quality and usefulness of chemistry-transport models such as EMEP and CHIMERE but provides complementary observations from areas crucially lacking such data and provides an alert as to the risk of underestimating nitrogen deposition in this mountain area when working on the basis of these predictions. Our results stress the need to improve the evaluation of N deposition (both through improvement of observations and models) in high-elevation ecosystems which are home to a substantial and original part of world biodiversity.

Methods

The study was conducted at eight sites in the central part of the French Pyrenees (see Supplementary Fig. S1), in open subalpine habitat areas (between 1,500 and 2,000 m a.s.l.). This region is under a cold sub-oceanic climate with annual precipitation of 1245 mm and annual mean temperature of 9.6 °C on average over the past five years (data from Meteo-France for the stations presented in Supplementary Table S2). The Pyrenean subalpine belt is characterized by a mosaic of extensively grazed grasslands, heathlands and scattered conifers groves.

Bulk N deposition measurements

Bulk N deposition was measured over one year (from June 2012 to May 2013). From June to October, each site was equipped with two 20 cm diameter HDPE funnels, each connected to a PVC column (1/2" diameter and 30 cm length) filled with 30 g of mixed-bed ion-exchange resin (IONAC® NM-60, Lanxess) and fixed 2 m above ground. A polyester fibre plug was inserted at the connection between the funnel and the column to prevent the entry of insects or large particles into the column. Resin columns were protected from excessive heating by being inserted into 10 cm diameter PVC tubes. This device was adapted from Fenn & Poth

(2004). Because sampled water passes through the resin column without any stagnation, the device limits N loss due to algal or bacterial development. One of the two columns was exposed over periods of one month, the other was exposed during the entire sampling period (five months). Columns were pre-rinsed with 100 mL of deionized water and extracted twice by percolating 200 mL of 2 M KCl. Columns exposed over five months did not show signs of resin saturation, however they were more susceptible to human or animal degradation (one stolen, two degraded by bird droppings). Thus we chose to exploit only the results from the one-month exposure columns. The comparison between the sum of the five one-month exposure columns and the five-month exposure columns allowed us to check for intra-site variability. On average, this variability was of 12% for NO_3^- and 19% for NH_4^+ .

We employed a method similar to that of Susfalk & Johnson (2002) and Brooks *et al.* (1996) to measure winter bulk N deposition. In November, at each site, two HDPE tubes (16 cm diameter and 12 cm length) were installed in the soil at least 1 m apart. The tubes contained 150 g of mixed-bed ion-exchange resin (IONAC® NM-60, Lanxess) in a water-porous bag of the same diameter inserted between two porous polyethylene foam discs to prevent direct contact with snow on the top and soil at the bottom but to allow snow melt water circulation through the device. Tubes protruded 2.5 cm above soil surface to limit potential external contamination and avoid disturbance of the natural deposition and accumulation of snow. They were installed on flat or gently sloping areas to limit potential resin contamination by soil erosion during melting. No trace of soil matter was found inside the devices at their removal. The low vegetation surrounding the tubes and the absence of livestock during the exposure period would have limited the risks of resin contamination by splash during rain events or droppings from animals. Although wild fauna droppings cannot be excluded, it remains improbable that they could have occurred similarly across all the sites. Contaminations might also have occurred from blown soil or organic matter dust but would represent very low amounts as most of the exposure period corresponded to the presence of a snow pack or humid atmospheric and edaphic conditions. Due to low winter temperatures and the absence of water stagnation in our device, microbial contamination was expected to be absent or insignificant. At the end of the sampling period (May), the resins were collected, pre-rinsed with 500 mL of deionized water and extracted twice by stirring for 30 minutes with 500 mL of a 2 M KCl solution. The results of the two bags at each site were averaged. Winter measurements at the *Sup* site were discarded as the sampling devices were not retrieved at the same date as for the other sites because of blocked access to the site after a flooding event. Intra-site variability was on average for the seven sites of 20% for

NH_4^+ (ranging from 0.3 to 23.5 %, with the *Mou* site being an exception at 60%) and 48% for NO_3^- (ranging from 7.9 to 49.7%, with the *Bei*, *Mou* and *Puy* sites presenting exceptionally high variability: respectively 78.4, 70.8 and 80%). This variability may be explained by differences in snow heights and snow melt water pathways as already suggested in other studies (Bowman, 1992; Brooks *et al.*, 1996). The greater variability observed for NO_3^- compared to NH_4^+ could be consistent with this explanation as phenomena of preferential elution of some ionic species over others at different stages of the melting process have been suggested (Williams & Melack, 1991).

As controls, unexposed capped blank columns were installed on 3 sites during the summer period and hermetically wrapped blank resin bags were installed in the soil at 2 sites during the winter period. Blank resins were installed on and retrieved from the sites at the same time as exposed resins, and were extracted and analyzed in the same way as sampling resins. No detectable concentrations of NO_3^- were found in blank extracts from the columns and NO_3^- in the blank extracts from the winter devices represented $14 \% \pm 13 \%$ (mean \pm sd) of the total NO_3^- found in exposed resins. Blank values for NH_4^+ represented $40 \% \pm 18 \%$ of NH_4^+ extracted from exposed resins columns and $35 \% \pm 13 \%$ of NH_4^+ extracted from exposed winter devices. These blank values were retrieved from the sampling results. NH_4^+ contamination in the blank resins can arise from the release of quaternary amine compounds from the resin polymer (Fenn & Poth, 2004) and from the presence of background levels of N in the KCl salt used in the extraction solution. Extracts were analyzed by colorimetry (ALPKEM continuous flow analyzer). For the columns, the first extraction recovered 100% of the total NH_4^+ and NO_3^- fixed on the resin (the second extraction did not recover any further N ions). For the bags, the N ions retrieved by the two successive extractions were summed (on average, first extraction recovered 70% of the total N recovered by the two extractions).

Air gaseous N concentration measurements

Air gaseous NO_2 and NH_3 were sampled with radial passive diffusive samplers (Radiello®, Supelco Analytical). The limit of detection was $1 \mu\text{g m}^{-3}$ for 24 hour exposure for NH_3 and 1 ppb after 7 days exposure for NO_2 . Samplers were exposed over a two-week period each month from June to October 2012 using the device supplied by the manufacturer. Adsorbing cartridges were then extracted in deionized water according to the manufacturer's recommendations and the extracts analyzed by colorimetry (ALPKEM continuous flow analyzer). The results were converted into mean gas concentration in air (in $\mu\text{g N m}^{-3}$) over the sampling period according to the manufacturer's equations (accounting for NO_2^- or NH_4^+ mass found in

the cartridge, exposure time, sampling rate and temperature during exposure for NO₂, measured with data loggers (Lascar EL-USB-2+, Lascar Electronics)). Correction of the sampling rates for atmospheric pressure was considered as negligible (Fondazione Salvatore Maugeri - IRCCS, 2006). As NO₂ concentration was first obtained in ppb, the conversion to $\mu\text{g m}^{-3}$ was made taking into account the temperature and atmospheric pressure at the sites (Gerosa *et al.*, 2012). In order to check repeatability, 3 sites were equipped with 3 replicate samplers over each sampling period. On average, variability ranged from 5 to 25% depending on the site. For controls, laboratory blank cartridges from the same batches as those exposed were analyzed.

Chemistry-transport models

The eulerian chemistry-transport models CHIMERE (version 2012) and EMEP (version rv4.5) provided estimates of N deposition. Although they have roughly the same approach, they are based on different technical characteristics (meteorology, emissions and chemical mechanisms).

The CHIMERE model was developed, maintained and distributed by IPSL (CNRS) and INERIS. See Menut *et al.* (2013) for the model description. More information is available at <http://www.lmd.polytechnique.fr/chimere> (LMD (Laboratoire de Météorologie Dynamique), 2014). The CHIMERE model was run over France with a spatial resolution of 4 x 4 km. Boundary conditions for gaseous and particulate species were obtained from nested simulations over Europe. These simulations were conducted with the EMEP emission inventory (Vestreng, 2003) for anthropogenic emission and the MEGAN emission model (Guenther *et al.*, 2006) for biogenic emissions. Meteorology was obtained from the European Centre for Medium-Range Weather Forecasts (ECMWF) model.

The EMEP model was developed at the EMEP Centre MSC-W, hosted by the Norwegian Meteorological Institute. See Simpson *et al.* (2012) for the model description. Output data and more information are available at <http://www.emep.int/> (EMEP, 2013). The EMEP data were retrieved for France at a spatial resolution of 50 x 50 km. Meteorology was simulated from the ECMWF-IFS Cycle 38r2. Emissions were derived from 2012 official data submissions to UNECE CLRTAP (Fagerli *et al.*, 2014).

We compared our observations with the EMEP and CHIMERE data for the 2012 and 2013 calendar years. Inter-annual variability in the modelled data was very low and was negligible compared to the differences between modelled *vs.* observed data, as illustrated by the error bars in **Figure 2.1** and **Figure 2.3**. Data available are annual means of NO₂ and NH₃ air

concentrations ($\mu\text{g N m}^{-3}$) and annual accumulation of dry or wet and reduced or oxidized N (mg N m^{-2} ; see Supplementary Table S1). In the case of EMEP data, the NH_3 concentration was not directly available but was calculated as $[\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+]$ minus [Fine NH_4^+ particulate matter].

Data analysis

All analyses were conducted in *R* v3.0.2 (R Development Core Team, 2008). Bilinear interpolation of modelled data to match monitored sites was conducted with the packages *rgdal* (Bivand *et al.*, 2014) and *akima* (Akima *et al.*, 2013). Non-parametric paired Wilcoxon-ranked-sum-tests were used to test the significance of the difference between observations and modelled values across the eight sites (averaged between the two years). Deposition values were compared between bulk deposition measurements (rain + snow) and total modelled deposition (wet + dry), excluding the *Sup* site where snow deposition was not accounted for. Error metrics commonly used in model evaluations such as mean normalized absolute error (MNAE) and mean normalized bias (MNB) were calculated.

References

- Akima, H., Gebhardt, A., Petzoldt, T. & Maechler, M. (2013) *akima*: Interpolation of irregularly spaced data. Available at: <http://cran.r-project.org/package=akima>. (Accessed: 29th September 2014).
- Balestrini, R., Galli, L. & Tartari, G. (2000) Wet and dry atmospheric deposition at prealpine and alpine sites in northern Italy. *Atmospheric Environment*, **34**, 1455–1470.
- Baumgardner, R.E., Isil, S.S., Lavery, T.F., Rogers, C.M. & Mohnen, V.A. (2003) Estimates of cloud water deposition at mountain acid deposition program sites in the Appalachian mountains. *Journal of the Air & Waste Management Association*, **53**, 291–308.
- Bergstrom, A.-K. & Jansson, M. (2006) Atmospheric nitrogen deposition has caused nitrogen enrichment and eutrophication of lakes in the northern hemisphere. *Global Change Biology*, **12**, 635–643.
- Bivand, R., Keitt, T. & Rowlingson, B. (2014) *rgdal*: Bindings for the Geospatial Data Abstraction Library. Available at: <http://cran.r-project.org/package=rgdal>. (Accessed: 29th September 2014).
- Bobbink, R., Hicks, K., Galloway, J., Spranger, T., Alkemade, R., Ashmore, M., Bustamante, M., Cinderby, S., Davidson, E., Dentener, F., Emmett, B., Erisman, J.-W., Fenn, M., Gilliam, F., Nordin, A., Pardo, L. & De Vries, W. (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological applications*, **20**, 30–59.
- Bowman, W. (1992) Inputs and storage of nitrogen in winter snowpack in an alpine ecosystem. *Arctic and Alpine Research*, **24**, 211–215.
- Brooks, P., Williams, M. & Schmidt, S. (1996) Microbial activity under alpine snowpacks, Niwot Ridge, Colorado. *Biogeochemistry*, **32**, 93–113.
- Camarero, L. & Catalan, J. (1993) Chemistry of bulk precipitation in the central and eastern Pyrenees, northeast Spain. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, **27**, 83–94.

- Clark, C.M. & Tilman, D. (2008) Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, **451**, 712–5.
- Curtis, C.J., Botev, I., Camarero, L., Catalan, J., Cogalniceanu, D., Hughes, M., Kernan, M., Kopáček, J., Korhola, A., Psenner, R., Rogora, M., Stuchlík, E., Veronesi, M. & Wright, R.F. (2005) Acidification in European mountain lake districts: a regional assessment of critical load exceedance. *Aquatic Sciences*, **67**, 237–251.
- Dämmgen, U., Erisman, J.W., Cape, J.N., Grünhage, L. & Fowler, D. (2005) Practical considerations for addressing uncertainties in monitoring bulk deposition. *Environmental pollution*, **134**, 535–48.
- Duprè, C., Stevens, C.J., Ranke, T., Bleeker, A., Peppler-Lisbach, C., Gowing, D.J.G., Dise, N.B., Dorland, E., Bobbink, R. & Diekmann, M. (2010) Changes in species richness and composition in European acidic grasslands over the past 70 years: the contribution of cumulative atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology*, **16**, 344–357.
- EMEP (2013) EMEP Home. Available at: <http://www.emep.int/>. (Accessed: 9th June 2015)
- Fagerli, H., Schulz, M., Gauss, M., Tsyro, S., Jonson, J.E., Benedictow, A., Semeena, V.S., Wind, P. & Olivié, D. (2014) *Transboundary particulate matter, photo-oxidants, acidifying and eutrophying components*, Oslo, Norway. **EMEP Report 1/2014**. Available at: http://emep.int/publ/reports/2014/EMEP_Status_Report_1_2014.pdf. (Accessed: 9th June 2015)
- Fenn, M.E. & Poth, M.A. (2004) Monitoring nitrogen deposition in throughfall using ion exchange resin columns: a field test in the San Bernardino mountains. *Journal of Environmental Quality*, **33**, 2007–2014.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M.A., Cape, J.N., Reis, S., Sheppard, L.J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J.N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A.F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M. & Voss, M. (2013) The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **368**, 20130164.
- Fondazione Salvatore Maugeri - IRCCS (2006) Radiello's Manual. **v. 01 - 2006**, Available at: [http://www.radiello.com/english/Radiello's manual 01-06.pdf](http://www.radiello.com/english/Radiello's%20manual%2001-06.pdf). (Accessed: 3rd April 2015).
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L. a, Seitzinger, S.P. & Sutton, M. a (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, **320**, 889–92.
- García-Gómez, H., Garrido, J.L., Vivanco, M.G., Lassaletta, L., Rábago, I., Avila, A., Tsyro, S., Sánchez, G., González Ortiz, A., González-Fernández, I. & Alonso, R. (2014) Nitrogen deposition in Spain: Modeled patterns and threatened habitats within the Natura 2000 network. *The Science of the total environment*, **485-486**, 450–460.
- Gerosa, G., Finco, A., Marzuoli, R., Ferretti, M. & Gottardini, E. (2012) Errors in ozone risk assessment using standard conditions for converting ozone concentrations obtained by passive samplers in mountain regions. *Journal of Environmental Monitoring*, **14**, 1703–1709.
- Guenther, A., Karl, T., Harley, P., Wiedinmyer, C., Palmer, P.I. & Geron, C. (2006) Estimates of global terrestrial isoprene emissions using MEGAN (Model of Emissions of Gases and Aerosols from Nature). *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, **6**, 3181–3210.
- Gultepe, I., Tardif, R., Michaelides, S. C., Cermak, J., Bott, A., Bendix, J., Müller, M. D., Pagowski, M., Hansen, B., Ellrod, G., Jacobs, W., Toth, G. & Cober, S. G. (2007) Fog Research: A Review of Past Achievements and Future Perspectives. *Pure and Applied. Geophysics*, **164**, 1121–1159.
- Hautier, Y., Niklaus, P.A. & Hector, A. (2009) Competition for light causes plant biodiversity loss after eutrophication. *Science*, **324**, 636–8.
- Hjellbrekke, A. & Fjaeraa, A.M. (2013) *Data Report 2011: Acidifying and eutrophying compounds and particulate matter*, Kjeller, Norway. **EMEP/CCC-Report 2/2013**, 141.

- Horswill, P., O'Sullivan, O., Phoenix, G.K., Lee, J.A. & Leake, J.R. (2008) Base cation depletion, eutrophication and acidification of species-rich grasslands in response to long-term simulated nitrogen deposition. *Environmental pollution*, **155**, 336–49.
- Kirchner, M., Fegg, W., Römmelt, H., Leuchner, M., Ries, L., Zimmermann, R., Michalke, B., Wallasch, M., Maguhn, J., Faus-Kessler, T. & Jakobi, G. (2014) Nitrogen deposition along differently exposed slopes in the Bavarian Alps. *The Science of the total environment*, **470-471**, 895–906.
- Körner, C. (1999) *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*, 1st edn. Springer.
- Lamaze, T., Pasche, F. & Pornon, A. (2003) Uncoupling nitrogen requirements for spring growth from root uptake in a young evergreen shrub (*Rhododendron ferrugineum*). *New Phytologist*, **159**, 637–644.
- LMD (Laboratoire de Météorologie Dynamique) (2014) The Chimere chemistry-transport model.
- Löflund, M., Kasper-Giebl, A., Stopper, S., Urban, H., Biebl, P., Kirchner, M., Braeutigam, S. & Puxbaum, H. (2002) Monitoring ammonia in urban, inner alpine and pre-alpine ambient air. *Journal of Environmental Monitoring*, **4**, 205–209.
- Lovett, G. & Kinsman, J. (1990) Atmospheric pollutant deposition to high-elevation ecosystems. *Atmospheric Environment*, **24A**, 2767–2786.
- Marschner, H., Häussling, M. & George, E. (1991) Ammonium and nitrate uptake rates and rhizosphere pH in non-mycorrhizal roots of Norway spruce. *Trees*, **5**, 14–21.
- Marty, C., Pornon, A. & Lamaze, T. (2009) High NH₄⁺ efflux from roots of the common alpine grass, *Festuca nigrescens*, at field-relevant concentrations restricts net uptake. *Environmental and Experimental Botany*, **67**, 84–86.
- McKane, R.B., Johnson, L.C., Shaver, G.R., Nadelhoffer, K.J., Rastetter, E.B., Fry, B., Giblin, A.E., Kielland, K., Kwiatkowski, B.L., Laundre, J. & Murray, G. (2002) Resource-based niches provide a basis for plant species diversity and dominance in arctic tundra. *Nature*, **415**, 68–71.
- Menut, L., Bessagnet, B., Khvorostyanov, D., Beekmann, M., Blond, N., Colette, A., Coll, I., Curci, G., Foret, G., Hodzic, A., Mailler, S., Meleux, F., Monge, J.-L., Pison, I., Siour, G., Turquety, S., Valari, M., Vautard, R. & Vivanco, M.G. (2013) CHIMERE 2013: a model for regional atmospheric composition modelling. *Geoscientific Model Development*, **6**, 981–1028.
- Payne, R.J., Dise, N.B., Stevens, C.J. & Gowing, D.J. (2013) Impact of nitrogen deposition at the species level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 984–7.
- Phoenix, G.K., Emmett, B.A., Britton, A.J., Caporn, S.J.M., Dise, N.B., Helliwell, R., Jones, L., Leake, J.R., Leith, I.D., Sheppard, L.J., Sowerby, A., Pilkington, M.G., Rowe, E.C., Ashmore, M.R. & Power, S.A. (2012) Impacts of atmospheric nitrogen deposition: responses of multiple plant and soil parameters across contrasting ecosystems in long-term field experiments. *Global Change Biology*, **18**, 1197–1215.
- Phoenix, G.K., Hicks, W.K., Cinderby, S., Kuylensstierna, J.C.I., Stock, W.D., Dentener, F.J., Giller, K.E., Austin, A.T., Lefroy, R.D.B., Gimeno, B.S., Ashmore, M.R. & Ineson, P. (2006) Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology*, **12**, 470–476.
- Pornon, A., Escaravage, N. & Lamaze, T. (2007) Complementarity in mineral nitrogen use among dominant plant species in a subalpine community. *American Journal of Botany*, **94**, 1778–1785.

- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. Available at: <http://www.r-project.org>. (Accessed: 29th September 2014).
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, a., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H. a., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M. & Wall, D.H. (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, **287**, 1770–4.
- Simpson, D., Benedictow, a., Berge, H., Bergström, R., Emberson, L.D., Fagerli, H., Flechard, C.R., Hayman, G.D., Gauss, M., Jonson, J.E., Jenkin, M.E., Nyíri, a., Richter, C., Semeena, V.S., Tsyro, S., Tuovinen, J.-P., Valdebenito, Á. & Wind, P. (2012) The EMEP MSC-W chemical transport model – technical description. *Atmospheric Chemistry and Physics*, **12**, 7825–7865.
- Simpson, D., Fagerli, H., Hellsten, S., Knulst, J.C. & Westling, O. (2006) Comparison of modelled and monitored deposition fluxes of sulphur and nitrogen to ICP-forest sites in Europe. *Biogeosciences*, **3**, 337–355.
- Stevens, C.J., Duprè, C., Dorland, E., Gaudnik, C., Gowing, D.J.G., Bleeker, A., Diekmann, M., Alard, D., Bobbink, R., Fowler, D., Corcket, E., Mountford, J.O., Vandvik, V., Aarrestad, P.A., Muller, S. & Dise, N.B. (2010) Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. *Environmental pollution*, **158**, 2940–5.
- Susfalk, R. & Johnson, D. (2002) Ion exchange resin based soil solution lysimeters and snowmelt solution collectors. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **33**, 1261–1275.
- Swall, J.L. & Foley, K.M. (2009) The impact of spatial correlation and incommensurability on model evaluation. *Atmospheric Environment*, **43**, 1204–1217.
- Thöni, L., Brang, P., Braun, S., Seitler, E. & Rihm, B. (2004) Ammonia monitoring in Switzerland with passive samplers: patterns, determinants and comparison with modelled concentrations. *Environmental Monitoring and Assessment*, **98**, 93–107.
- Vestreng, V. (2003) *Review and revision, emission data reported to CLRTAP*, Oslo, Norway. Available at: <http://tfeip-secretariat.org/assets/Meetings/Documents/Previous-Meetings/Poland-Sept-2003/ReviewandrevisionMSCWStatusReport2003.pdf>. (Accessed: 11th June 2015).
- Williams, M.W. & Melack, J.M. (1991) Solute chemistry of snowmelt and runoff in an alpine basin, Sierra Nevada. *Water resources research*, **27**, 1575–1588.
- Zapletal, M., Kuňák, D. & Chroust, P. (2007) Chemical characterization of rain and fog water in the Cervenohorske Sedlo (Hruby Jeseník Mountains, Czech Republic). *Water, Air, and Soil Pollution*, **186**, 85–96.

Acknowledgments

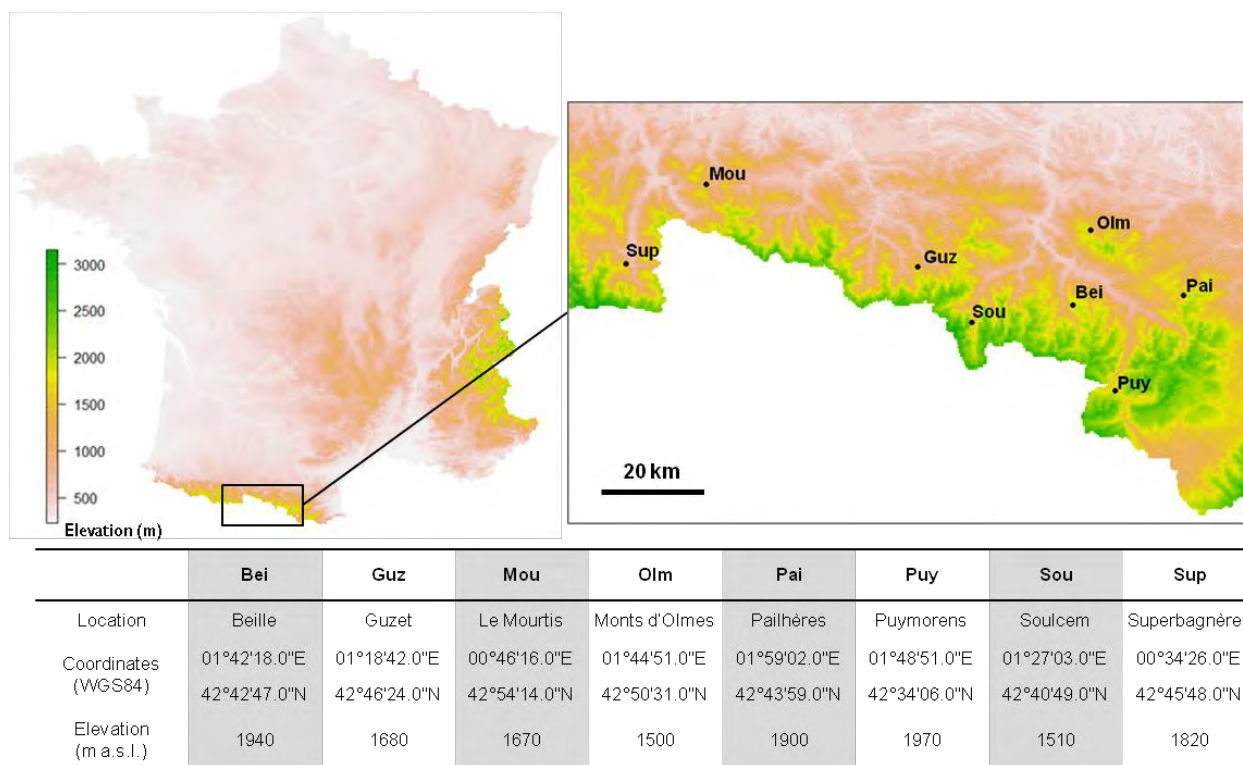
We thank Augustin Colette from the INERIS for access to CHIMERE data; Virginie Payre-Suc for performing colorimetry analyses; Ewelina Grzeskiewicz for assistance with the field and lab work; Peter Winterton, Hervé Sentenac and Yann Kerr for comments on the manuscript. This work was funded by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME; ANEMONE project N° 1262C0013), the region Midi-Pyrénées (ANEMONE project N° 11051284) and the Observatoire Homme Milieux Pyrénées (OHM) du Haut Vicdessos. The

study was also supported by the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

Author contributions

M.B., T.L. and A.P. designed the study. M.B. performed field and lab work with contributions from A.P. and T.L. F.C. ran CHIMERE simulations. All authors discussed the results. M.B. wrote the paper with contributions from T.L, A.P and F.C..

SUPPLEMENTARY INFORMATION



Supplementary Figure S1. Location of the study sites. The map was generated with *R* v3.0.2 and *rgdal* using the digital elevation model BD ALTI® MNT 500m from the French National Geographic Institute (IGN) (Open Licence).

Model	Year	Site	Air concentration ($\mu\text{g N m}^{-3}$)		Dry deposition ($\text{mg N m}^{-2} \text{yr}^{-1}$)		Wet deposition ($\text{mg N m}^{-2} \text{yr}^{-1}$)		Total deposition ($\text{mg N m}^{-2} \text{yr}^{-1}$)	
			NH ₃	NO ₂	Reduced N	Oxidized N	Reduced N	Oxidized N	Reduced N	Oxidized N
EMEP	2012	<i>Bei</i>	1.04	0.60	163	60	414	197	576	257
		<i>Guz</i>	1.34	0.63	224	49	549	225	773	274
		<i>Mou</i>	1.35	0.82	253	62	567	238	821	301
		<i>Olm</i>	0.92	0.67	176	82	421	225	597	307
		<i>Pai</i>	0.77	0.77	168	96	408	250	576	346
		<i>Puy</i>	1.06	0.67	156	57	409	199	565	255
		<i>Sou</i>	1.28	0.57	192	42	493	201	685	243
		<i>Sup</i>	1.24	0.59	197	44	481	197	678	241
	2013	<i>Bei</i>	0.97	0.58	156	51	432	190	588	241
		<i>Guz</i>	1.27	0.62	220	41	524	195	744	236
		<i>Mou</i>	1.27	0.81	245	55	608	256	853	311
		<i>Olm</i>	0.86	0.67	170	70	468	242	638	312
		<i>Pai</i>	0.72	0.78	161	82	450	263	611	345
		<i>Puy</i>	0.98	0.65	149	47	410	177	559	224
		<i>Sou</i>	1.19	0.55	187	35	468	167	655	201
		<i>Sup</i>	1.17	0.58	191	37	501	204	692	241
CHIMERE	2012	<i>Bei</i>	0.56	0.20	75	57	123	145	198	202
		<i>Guz</i>	0.84	0.18	105	53	132	134	236	188
		<i>Mou</i>	1.38	0.42	170	66	142	121	312	186
		<i>Olm</i>	1.08	0.60	128	77	127	130	255	207
		<i>Pai</i>	0.53	0.31	85	76	123	144	208	220
		<i>Puy</i>	0.38	0.63	44	60	102	138	145	198
		<i>Sou</i>	0.58	0.15	68	48	135	152	203	200
		<i>Sup</i>	0.83	0.22	102	51	129	139	231	190
	2013	<i>Bei</i>	0.53	0.20	72	48	118	141	190	189
		<i>Guz</i>	0.78	0.18	103	46	134	133	237	179
		<i>Mou</i>	1.32	0.42	169	60	165	139	334	199
		<i>Olm</i>	1.05	0.62	126	70	145	147	271	217
		<i>Pai</i>	0.49	0.31	84	67	123	147	207	214
		<i>Puy</i>	0.33	0.63	39	49	99	130	138	179
		<i>Sou</i>	0.52	0.15	62	38	124	142	186	180
		<i>Sup</i>	0.72	0.21	100	43	132	139	232	183

Supplementary Table S1. Modelled data from EMEP and CHIMERE after spatial interpolation. NH₃ and NO₂ air concentrations ($\mu\text{g N m}^{-3}$), annual reduced and oxidized dry, wet and total (dry + wet) N deposition ($\text{mg N m}^{-2} \text{yr}^{-1}$) estimated with the models EMEP and CHIMERE for the calendar years 2012 and 2013.

		Ascou	Aston	Augirein	Aulus	Bagnères	Cierp	Hospitalet	Olmes	Puymorens	Vicdessos
Location	Longitude	1°53'5 4"E	1°41'2 8"E	0°55'0 6"E	1°20'0 0"E	0°35'4 8"E	0°38'1 2"E	1°47'4 2"E	1°44'3 6"E	1°49'3 6"E	1°29' 12"E
	Latitude	42°43' 18"N	42°43' 27"N	42°55' 54"N	42°47' 36"N	42°48' 00"N	42°54' 42"N	42°35' 18"N	42°50' 36"N	42°32' 48"N	42°46' 18"N
	Elevation (m a.s.l.)	1,120	1,781	631	733	620	500	1,425	1,500	1,620	750
Measured precipitation (mm)	2012	1,115	960	1,077	1,580	899	919	1,014	1,507	703	1,089
	2013	1,708	1,439	1,920	2,500	1,643	n.a.	1,400	2,214	n.a.	1,780
	June 2012 – May 2013	1,533	1,232	1,604	2,140	1,350	n.a.	1,191	1,961	n.a.	1,442
EMEP precipitation (mm)	2012	1,041	961	1,140	1,132	1,148	1,130	974	996	956	1,029
	2013	1,459	1,664	1,602	1,656	1,667	1,294	974	1,426	1,261	1,436
CHIMERE precipitation (mm)	2012	845	894	965	936	933	902	711	884	679	1,011
	2013	1,133	1,172	1,257	1,208	1,160	1,163	950	1,170	919	1,306

Supplementary Table S2. Precipitation. Yearly precipitation accumulation (mm) at 10 meteorological stations close to the N deposition measurement sites. Measured precipitation for these stations were provided by Meteo-France. Modelled precipitation values from EMEP and CHIMERE were matched to these stations using the same methodology as for N concentration and deposition data (bilinear interpolation). Data are presented for the two calendar years of modelled data used in the study (2012-2013) and for the N measurement period of the study (June 2012 – May 2013) for measured precipitation. n.a.: measurements were lacking for some months of 2013 at these stations.

2.2. Test d'une méthode de biosurveillance des dépôts atmosphériques azotés par la teneur en azote de lichens

2.2.1. Contexte et résumé

Dans la section précédente, nous avons mis en évidence la difficulté d'obtenir des estimations fiables des dépôts azotés à haute résolution spatiale et à l'échelle des Pyrénées. La biosurveillance, c'est-à-dire l'utilisation d'organismes biologiques pour obtenir des informations quantitatives sur certaines caractéristiques de la biosphère (Markert *et al.*, 2003), pourrait donc être une alternative intéressante. En particulier, la teneur en azote des lichens, ou le rapport entre teneur en azote et en carbone, semblent être de bons bioindicateurs des dépôts azotés d'après plusieurs études (**Table 2.3**). En effet, en l'absence de racines et de cuticule, les lichens absorbent les nutriments en proportion de leur abondance dans l'atmosphère. Cependant, la plupart de ces études ont été réalisées dans des contextes de forts gradients de dépôts azotés : soit à l'échelle nationale ou continentale, soit le long d'un gradient d'éloignement à une source d'émissions (ville, axe routier, élevage...).

Nous avons étudié la relation entre dépôts azotés et teneurs en N et en carbone (C) des lichens le long d'un gradient régional de dépôts azotés de faible amplitude. Sur les huit sites subalpins sur lesquels les dépôts azotés ont été mesurés, des lichens terricoles des espèces *Cladonia arbuscula* subsp. *squarrosa* (Wallr.) Ruoss, *Cladonia rangiferina* (L.) F.H. Wigg., *Cladonia mitis* (*Cladonia arbuscula* subsp. *mitis* (Sandst.) Ruoss) et *Cladonia portentosa* (Dufour) Coem. ont été échantillonnés. Une relation entre teneur en N de ces lichens et dépôts azotés a déjà été mise en évidence par plusieurs études (Hyvärinen & Crittenden, 1998; Remke *et al.*, 2009; Britton & Fisher, 2010). Le lichen saxicole *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. a également été échantillonné car facilement reconnaissable et présent sur tous les sites.

Sur les huit sites étudiés, nous n'avons observé aucune corrélation entre les différentes composantes des dépôts azotés mesurées et la teneur en azote (ou le rapport C:N) chez *Cladonia* spp.. Chez *Parmelia saxatilis*, seuls les dépôts d'azote oxydé dans les pluies sont corrélés positivement à la concentration en azote du thalle. Les concentrations en azote et les rapports C:N dans les thalles des différentes espèces ne sont pas corrélés. Ces résultats suggèrent que, dans un contexte de dépôts et gradient faibles, d'autres facteurs influençant la teneur en azote des thalles pourraient masquer la relation avec les dépôts azotés.

En revanche, les teneurs en carbone des thalles des différentes espèces sont positivement corrélées entre elles, et sont négativement corrélées avec certaines composantes des dépôts (concentration en NH_3 dans l'air pour les deux types de lichens, et NH_4^+ dans la pluie et la neige pour *Cladonia* spp.). La concentration en carbone dans les thalles, même si elle est régulièrement mesurée en même temps que la concentration en azote, est rarement reliée aux dépôts azotés. Il serait donc intéressant que ces relations soient plus régulièrement explorées.

Globalement, il semble qu'aucun des lichens étudiés ne permette d'avoir une bonne estimation de la totalité de l'azote reçu localement par les écosystèmes à l'échelle du massif Pyrénéen, ce qui réduit fortement leur intérêt pour la biosurveillance dans ce contexte.

2.2.2. Article : **Can lichens be suitable biomonitors of low-level nitrogen deposition at the scale of a mountainous region?**

Marion Boutin^{1,2}, Thierry Lamaze² and André Pornon¹.

¹Université Toulouse 3 Paul Sabatier, CNRS, ENFA, UMR5174 Laboratoire Evolution & Diversité Biologique, 118 route de Narbonne F-31062 Toulouse, France

²Centre d'Etudes Spatiales de la BIOSphère, F-31401 Toulouse, France

Correspondence to: marionboutin@free.fr

In preparation

Abstract

Nitrogen (N) deposition increased during the past decades and is leading to changes in ecosystems functioning and biodiversity. The study of these impacts requires cost-effective techniques to spatially evaluate N deposition loads. Mountain ecosystems are considered among the most sensitive habitats to N deposition effects but both direct measurements and modelling of N deposition remain difficult to achieve in such regions. N concentration in lichens has already been shown as a promising biomonitor for N deposition, but generally along steep gradients including both low and very high N deposition levels. In this study we tested the potential of such a biomonitoring method in the context of a mountainous region receiving relatively low levels of N deposition. We measured N deposition over one year at eight sites and explored the relations with N and C concentrations in terricolous lichens of the *Cladonia* genus and in a saxicolous lichen (*Parmelia saxatilis*). We found (i) no relation between neither $[N]_{\text{lich}}$ nor $C:N_{\text{lich}}$ in the apex of *Cladonia* species and N deposition, (ii) significant relations between $[N]_{\text{lich}}$ in the thallus of *Parmelia saxatilis* and NO_3^- deposition in rain and (iii) negative relations between $[C]_{\text{lich}}$ and reduced N deposition. None of the tested species appeared to be a reliable biomonitor for total nitrogen deposition in this context. Although these results do not totally impair the interest of lichen biomonitoring in this region (especially for *P. saxatilis*), they rise important limitations of the method. In addition, our results suggest that the relation between $[C]_{\text{lich}}$ and nitrogen deposition should be more often explored in such studies.

Keywords

Nitrogen, lichens, biomonitoring, air pollution, mountain

Introduction

Nitrogen (N) deposition has considerably increased during the past decades on account of anthropogenic emissions of reactive N to the atmosphere (Galloway *et al.*, 2004). N deposition affects natural and semi-natural terrestrial ecosystems by four main processes. N enrichment leads to eutrophication as many terrestrial ecosystems are limited (or co-limited) by N availability (Elser *et al.*, 2007). N deposition can cause the depletion of soil basic cations and the loss of acid neutralizing capacity, leading to soil acidification (Horswill *et al.*, 2008). High concentrations of reactive N in the air or in the precipitation can cause direct toxicity to sensitive organisms (especially lichens and mosses; Pearson & Stewart, 1993; Krupa, 2003; Cape *et al.*, 2009) or enhance sensibility to stress and perturbation (frost, drought, pathogens, herbivores,...; Sheppard *et al.*, 2009). These processes affect species diversity in many habitats, placing N deposition at the third rank of global change drivers of biodiversity loss by 2100 (Sala *et al.*, 2000).

The impacts of elevated N deposition on ecosystems and their biodiversity begin to be better understood thanks to many experimental and empirical studies. Useful tools for the evaluation of habitats' sensitivity (i.e. their responsiveness to a particular level of N deposition), such as critical loads, have been developed (Bobbink *et al.*, 2010). At the same time, progress has also been made on the evaluation of ecosystems' vulnerability (i.e. the likelihood of a response given the level of N deposition to which the ecosystem is actually exposed) via the improvement and diversification of tools for the estimation of N deposition such as measurement networks, chemistry-transport modelling and biomonitoring (*i.e.* the use of bio-organisms to obtain quantitative information on certain characteristics of the biosphere; Markert *et al.*, 2003). Recent studies highlighted that long-term low but chronic N deposition may have a detrimental effect on plant communities (Clark & Tilman, 2008; Stevens *et al.*, 2010; Phoenix *et al.*, 2012; Payne *et al.*, 2013). Thus, critical loads established on the basis of high N addition experiments or spatial gradients of N deposition in highly impacted areas might have been overestimated. More areas on the planet than previously thought, and especially biodiversity hot-spots and priority conservation areas, might thus be threatened by long-range N pollution (Phoenix *et al.*, 2006). The establishment of more reliable critical loads (by the development of empirical models) and their application (monitoring of their exceedance) require to accurately evaluate N deposition at a fine spatial resolution and in contexts of low-level deposition. Ideally, all forms of N deposition should be accounted for in the determination of critical loads. Practically, efforts are centred primarily on dissolved

inorganic N (DIN), readily biologically available, and secondary on gaseous N (mainly NH_3 and NO_2 ; critical loads are in that case referred to as critical levels).

Alpine and subalpine open habitats are particularly of concern in this context. These ecosystems are often species-rich and of interest for conservation. Because of their remote situation, they are assumed to be exposed to lower levels of N pollution compared to lowland areas. Studies confirmed that they are particularly sensitive habitats to N deposition, even at relatively low levels of N addition (Bassin *et al.*, 2007, 2013; Onipchenko *et al.*, 2012). However, precise knowledge on the level and spatial variability of their exposure to N deposition is lacking to assess their vulnerability. Indeed, because of their remote situation, mountains lack measurement networks for N deposition and studies reporting punctual measurements in these regions are scarce (Lovett & Kinsman, 1990). Moreover, modelling N deposition in the context of complex topography and micrometeorology of mountains remains difficult. Biomonitoring could thus be a valuable alternative to estimate N deposition with simple implementation on the field, but remains to be tested in this context.

Lichens are interesting organisms for N pollution biomonitoring. As they lack cuticle and roots, they accumulate nutrients in proportion to their abundance in the atmosphere. As they are long-living perennial organisms, they integrate atmospheric conditions over long periods of time, thus potentially indicating more closely the effects of chronic cumulated exposition of a habitat to the pollutant. Lichens have been found to capture efficiently both nitrate and ammonium, the two main forms of dissolved inorganic N, from rainfall (Crittenden, 1989) and snow meltwater (Crittenden, 1998). Although less studied, amino acids assimilation has also been shown at rates suggesting that organic N compounds could also have a role in the N nutrition of lichens (Dahlman *et al.*, 2004). Absorption of dry deposited N (gaseous or particulate) is even less understood. Studies highlighted N accumulation by lichen in response to ammoniac (NH_3) and nitrogen oxides (NO_x) gradients during periods with low precipitation (Gombert *et al.*, 2003; Frati *et al.*, 2007), thus supporting the hypothesis that lichens are efficient trappers of dry deposition (Knops *et al.*, 1991).

Many studies have already highlighted the effects of N deposition on thalli N concentration ($[\text{N}]_{\text{lich}}$) in several lichen species (see **Table 2.3**). Most of them focused on epiphytic species that are relatively common, even in rural and urban areas provided that trees are present. Others explored the response of terricolous lichens, especially of the *Cladonia* genus. Three approaches can be distinguished: (i) transplantation or sampling of *in situ* lichens along transects of distance to a source of N emissions (battery farming, roads and industries), (ii) sampling of *in situ* lichens along spatial gradients of contrasted N deposition

and (iii) sampling of lichens exposed to experimental N addition (either *in situ* or in laboratory/greenhouse). Many of these studies implied exposition of lichens to large ranges of N (see **Table 2.3**), with results only applicable to regions exposed to high levels of N deposition. However some studies have already highlighted the interest of lichen biomonitoring of N deposition along narrow gradients of low-level N deposition (Remke *et al.*, 2009; McMurray *et al.*, 2013). $[N]_{\text{lich}}$ is by far the most studied parameter, but changes in C:N and N:P ratios, PME (phosphomonoesterase) activity and concentration of phytobionts (indicated by $[Chl_a]$) have also been shown to occur (see **Table 2.3**).

Table 2.3. Review of recent studies exploring the relation between N concentration in lichens thalli and N deposition.

Study	Method	N form	Response variable	Gradient	Species	Results
Hyvärinen and Crittenden, 1998a	In situ sampling (32 sites)	NH_4^+ , NO_3^- , NH_3 , $[\text{NO}_2]_{\text{air}}$ Sampling stations from the UK Acid Deposition Monitoring Network	[N], [P] Top 5mm and base	1 – 14 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹ (wet dep.)	<i>Cladonia portentosa</i> ^T	Positive correlation between $[\text{N}]_{\text{lich}}$ and N dep., stronger for the thallus base than the apex. $[\text{N}]_{\text{lich}}$ poorly correlated with [N] in the precipitation. Model is improved when $[\text{NO}_2]_{\text{air}}$ is included. No correlation between NH_3 dep. (modeled) and $[\text{N}]_{\text{lich}}$.
Gombert et al., 2003	In situ sampling (38 sites)	NO_x Not measured	[N] Whole thallus	Traffic density coefficient	<i>Physcia adscendens</i> ^E <i>Hypogymnia physodes</i> ^E	$[\text{N}]_{\text{lich}}$ correlated with the traffic density coefficient for <i>P. adscendens</i> but not <i>H. physodes</i> .
Vingiani et al., 2004	Transplant (11 sites)	NO_x Not measured	[N] Whole thallus	Distance of industries and roads in an urban area	<i>Pseudevernia furfuracea</i> ^E	$[\text{N}]_{\text{lich}}$ increased after transplantation into urban zone, but there was no pattern with traffic level.
Fenn et al., 2007	In situ sampling (11 sites)	TF DIN dep. Measured	[N] Whole thallus	5 – 25 kg N ha ⁻¹ 19 wks ⁻¹	<i>Evernia prunastri</i> ^E <i>Hypogymnia inactiva</i> ^E <i>Letharia vulpina</i> ^E <i>Plastimatia glauca</i> ^E <i>Xanthoparmelia cumberlandia</i> ^S	$[\text{N}]_{\text{lich}}$ pattern matched the TF DIN dep. pattern.
Frati et al., 2007	Transplant (4 sites)	$[\text{NH}_3]_{\text{air}}$ Measured	[N] Whole thallus	0.7 – 4.6 µg m ⁻³ Distance of a stockfarm	<i>Xanthoria parietina</i> ^E <i>Flavoparmelia caperata</i> ^E	Positive correlation between $[\text{N}]_{\text{lich}}$ and $[\text{NH}_3]_{\text{air}}$ or distance from the stockfarm.
Remke et al., 2009	In situ sampling (12 sites)	Total wet N dep. EMEP sampling stations	[N] Top 2 cm	2.16 – 6.37 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹	<i>Cladonia portentosa</i> ^T	Positive correlation between $[\text{N}]_{\text{lich}}$ and N dep.
Britton and Fisher, 2010	N addition in lab	NH_4^+ , NO_3^-	[N], mass change Whole thallus	0 – 20 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹	<i>Alectoria nigricans</i> ^T <i>Cetraria islandica</i> ^T <i>Cladonia rangiferina</i> ^T <i>Flavocetraria nivalis</i> ^T <i>Plastimatia glauca</i> ^T	$[\text{N}]_{\text{lich}}$ influenced by $[\text{N}]_{\text{precip}}$ and N load (relative importance of these two parameters differed between species). Mass change responded to $[\text{N}]_{\text{precip}}$ but not N load and varied among species.
Hogan et al., 2010	N addition in situ	NH_4^+ , NO_3^-	[N], N:P (top 5 mm) PME (top 10 mm)	0 – 56 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹ (+ 18 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹ background dep.)	<i>Cladonia portentosa</i> ^T	N addition increased $[\text{N}]_{\text{lich}}$, N:P _{lich} and PME activity.
Johansson et al., 2010	N addition in situ	NH_4^+ , NO_3^-	[N], N:P, $[\text{Chl}_a]$ Whole thallus	0 – 50 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹	<i>Alectoria sarmentosa</i> ^E <i>Plastimatia glauca</i> ^E	N addition increased $[\text{N}]_{\text{lich}}$, N:P _{lich} and $[\text{Chl}_a]$.
Olsen et al., 2010	Transplant & In situ sampling (6 sites)	$[\text{NH}_3]_{\text{air}}$ Measured	[N] Whole thallus	2 – 20 µg N-NH ₃ m ⁻³ Distance of a pig farm	<i>Xanthoria parietina</i> ^E	Positive correlation between $[\text{N}]_{\text{lich}}$ and $[\text{NH}_3]_{\text{air}}$.

Raymond et al., 2010	In situ sampling (4 sites with measured N dep., 15 sites with modeled estimates)	Dry, Wet, Total N dep. Measured and modeled estimates	[N] Whole thallus	2.64 – 8.59 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹ (total dep., measured) 1 – 25 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹ (total dep., modeled estimates)	<i>Plastimatia glauca</i> ^E <i>Parmelia sulcata</i> ^E <i>Hypogymnia physodes</i> ^E	Calibration unsuccessful: weak relations between [N] _{lich} and measured N dep. But at a larger scale, correlation between [N] _{lich} and model estimates for N dep.
Frati et al., 2011	Transplant (4 sites)	[NH ₃] _{air} Measured	[N] Whole thallus	2.1 – 45.4 µg m ⁻³ Distance of NH ₃ emission sources	<i>Evernia prunastri</i> ^E	Transplants accumulated N compared to controls, but [N] _{lich} did not follow the pattern of measured [NH ₃] _{air} .
McMurray et al., 2013	In situ sampling (9 sites)	TF DIN dep. Measured	[N] Whole thallus	0.78 – 4.13 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹	<i>Letharia vulpina</i> ^E <i>Usnea lapponica</i> ^E	Positive correlation between [N] _{lich} and TF DIN dep.
Munzi et al., 2013	N addition in lab	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻	[N], [C], C:N Whole thallus	0 – 1 M NH ₄ NO ₃ (8 applications)	<i>Evernia prunastri</i> ^E	N addition increased [N] _{lich} , decreased [C] _{lich} and C:N _{lich} .
Ochoa-Hueso et al., 2013	N addition in situ	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻	[N], C:N, PME Thallus fragments	0 – 50 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹	<i>Cladonia foliacea</i> ^T	N addition increased [N] _{lich} and decreased C:N _{lich} . PME increased with moderate N addition but decreased with high N addition (and PME response was dependent on soil properties).
Root et al., 2013	In situ sampling (84 sites)	TF DIN dep. Measured in previous studies from the literature	[N] Whole thallus	0.14 – 39 kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹	<i>Letharia vulpina</i> ^E <i>Plastimatia glauca</i> ^E <i>Evernia mesomorpha</i> ^E	Strong positive correlation between [N] _{lich} and TF DIN dep.

Notes: dep. = deposition; E = epiphyte; S = saxicolous; T = terricolous; TF DIN = throughfall dissolved inorganic N; PME = phosphomonoesterase; Chl_a = chlorophyll a.

In the present work we tested the potential of several lichen species as biomonitors of N deposition along a gradient of low-level N deposition in a mountainous region. We compared measurements of N deposition (inorganic N in bulk deposition and gaseous N concentration in air) with N concentration ($[N]_{\text{lich}}$), C concentration ($[C]_{\text{lich}}$) and C:N ratio ($C:N_{\text{lich}}$) in lichens thalli across eight high-elevation sites.

Material & Methods

Sites

The study was conducted at eight sites in the central part of the French Pyrenees (**Figure 2.4**), in open subalpine areas (between 1500 and 2000 m a.s.l.). These sites were selected for the presence of at least two lichen species among the targeted species list and their accessibility for a regular monitoring of N deposition measurement stations.

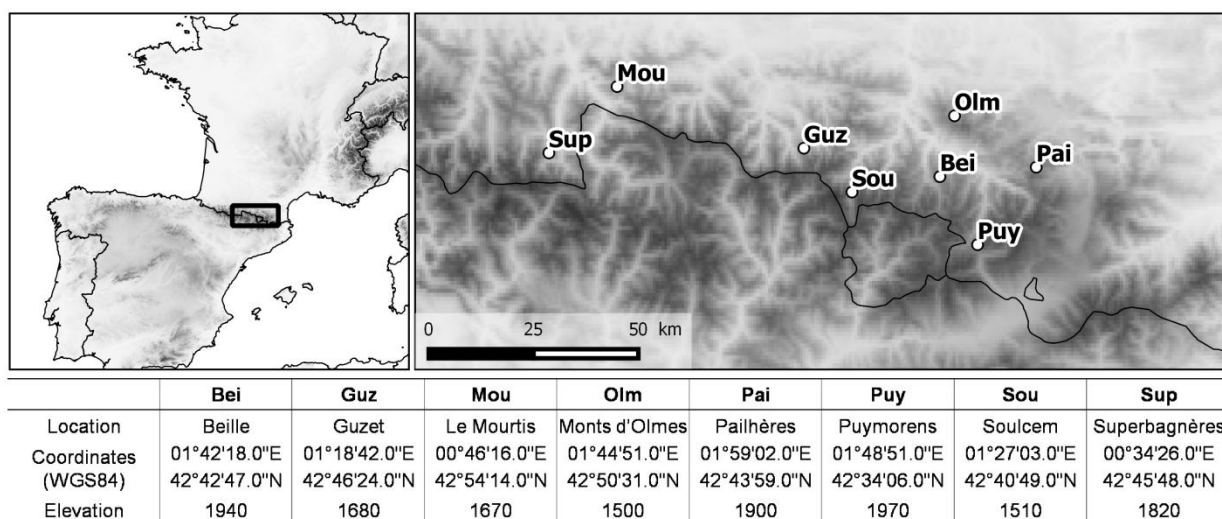


Figure 2.4. Location of the sites.

Nitrogen deposition measurements

We measured bulk N deposition (NO_3^- and NH_4^+) in rainfall and in snow melt water over one year (June 2012 to May 2013) using ion-exchange resin based collectors, and gaseous N (NO_2 and NH_3) concentration over one summer (June to October 2012) using passive diffusive samplers. See Boutin *et al.* (2015) - section 2.1 - for details on the measurements protocol.

Lichens sampling, preparation and analyses

Targeted lichen species had to match the following criteria: commonality in open subalpine habitats of the Pyrenees (which excludes uncommon species and corticolous lichens),

easiness to sample in the field and to determine (which excludes crustose and some foliose lichens), and absence of cyanobacteria (as they confer ability to integrate atmospheric N₂; thus excluding cyanolichens and chlorolichens with cephalodia). On the basis of precedent studies, we selected four fruticulose terricolous species from the *Cladonia* genus – *Cladonia arbuscula* subsp. *squarrosa* (Wallr.) Ruoss, *Cladonia rangiferina* (L.) F.H. Wigg., *Cladonia mitis* (*Cladonia arbuscula* subsp. *mitis* (Sandst.) Ruoss), *Cladonia portentosa* (Dufour) Coem. – as they were shown to be suitable for N biomonitoring (Hyvärinen & Crittenden, 1998; Remke *et al.*, 2009; Britton & Fisher, 2010) and one foliose saxicolous species (*Parmelia saxatilis* (L.) Ach.). Although these species were known to be relatively common in the Pyrenees, they were not all present or abundant at each site (**Table 2.4**). *Cladonia mitis* and *Cladonia portentosa* difficult to distinguish, were regrouped in *Cladonia* gr. *portentosa*.

Table 2.4. Number of lichen samples by species and by sites (after discarding of the samples presenting signs of damages, necrosis or not representative). The species *C. mitis* and *C. portentosa* were grouped as they were particularly difficult to distinguish. When less than 4 samples by species and by site were available, the samples were not accounted for in the statistical analyses.

	Bei	Guz	Mou	Olm	Pai	Puy	Sou	Sup	Total
<i>Cladonia arbuscula</i>	4	2	10	11	1	3	18	16	65
<i>Cladonia</i> gr. <i>portentosa</i>	16	-	1	2	20	25	8	1	73
<i>Cladonia rangiferina</i>	8	6	18	14	6	14	13	3	82
<i>Parmelia saxatilis</i>	8	8	18	10	6	14	17	9	90
Total	35	16	47	37	29	51	55	29	299

On each site, the sampling zone was delimited as the maximal area of homogeneous vegetation (for *Cladonia* spp.) or rocks (for *P. saxatilis*) type, exposition and altitudinal range. Samples were collected at least 5 m from each others to avoid sampling clones rather than different individuals. *Cladonia* spp. samples were taken in the middle of the lichen patch in order to limit contamination by surrounding soil and vegetation debris.

Samples were dried at ambient temperature. Species determination was checked under binocular magnifying glasses and with thallus reaction to paraphenylenediamine (Pd) and potassium hydroxide (K). Samples presenting signs of damages or necrosis (unusual thallus colour, black marks) and samples not representative (*i.e.* with only a few podetions sampled) were discarded. Substrate debris was retrieved and the first centimeter from the apex of the podetion (*Cladonia* spp.) or from the external edge of the thallus (*P. saxatilis*) was sampled. Samples were rinsed 20 seconds with deionized water to eliminate organic and mineral particulates and non assimilated nitrogenous compounds, dried 24h at 48°C and milled 4 min at 30 Hz (Tissue Lyser QIAGEN®). Milled samples were dried again 12h at 48°C to eliminate

residual humidity and analyzed for carbon (C) and nitrogen (N) concentration (NA 2100, CE Instruments Ltd.).

Data analysis

Differences between the species in $[N]_{\text{lich}}$, $[C]_{\text{lich}}$ and $C:N_{\text{lich}}$ were first tested by linear mixed-effect models (with the species as fixed effect and the site as random effect) followed by post-hoc Tukey tests. In order to respect normality requirements, a log transformation was applied on $[N]_{\text{lich}}$ and $C:N_{\text{lich}}$, a square-root transformation was applied on $[C]_{\text{lich}}$.

Mean values of $[N]_{\text{lich}}$, $[C]_{\text{lich}}$ or $C:N_{\text{lich}}$ were calculated by site for the species *P. saxatilis* (8 sites), *C. rangiferina* (7 sites) and *Cladonia* agg. (regrouping all *Cladonia* species, 8 sites). Because in half of the sites, the number of samples from *Cladonia* gr. *potentosa* and *Cladonia arbuscula* was insufficient, they were not considered separately. We tested correlations between mean $[N]_{\text{lich}}$, $[C]_{\text{lich}}$ or $C:N_{\text{lich}}$ and gaseous N concentration in air (NO_2 , NH_3) or inorganic N in bulk deposition (rain, snow or total and NO_3 , NH_4 or N total) for each of these species or species group. Spearman correlation tests were used without correction for multiple tests. We then applied linear regressions on the pairs of variables showing an interest for the bioindication according to the correlations results. Normality and homoscedasticity of the residuals were checked.

Finally, we tested for correlations of mean $[N]_{\text{lich}}$, $[C]_{\text{lich}}$ or $C:N_{\text{lich}}$ between the different species or species groups with Spearman correlation tests. All statistical analyses were performed with *R version 3.0.2* (R Development Core Team, 2008).

Results

On the eight sites, NO_3^- deposition ranged between 530 and 956 $\text{mg N m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ and NH_4^+ deposition ranged between 267 and 732 $\text{mg N m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$. Average NO_2 concentration in air during the summer period ranged between 0.27 and 1.02 $\mu\text{g N m}^{-3}$ and average NH_3 concentration between 0.50 and 1.32 $\mu\text{g N m}^{-3}$.

$[N]_{\text{lich}}$, $[C]_{\text{lich}}$ and $C:N_{\text{lich}}$ were significantly different ($P < 0.001$) between *P. saxatilis* and each *Cladonia* species. Among *Cladonia* species, no significant difference was found for neither $[N]_{\text{lich}}$, $[C]_{\text{lich}}$ or $C:N_{\text{lich}}$. We found values of $[N]_{\text{lich}}$, $[C]_{\text{lich}}$ and $C:N_{\text{lich}}$ of respectively 1.19 ± 0.03 % (mean \pm se), 45.46 ± 0.15 % and 39.81 ± 0.90 for *P. saxatilis* and of respectively 0.85 ± 0.01 %, 43.24 ± 0.05 % and 52.29 ± 0.57 for *Cladonia* agg.

No positive correlation of $[N]_{\text{lich}}$ with N deposition or concentration was found in *C. rangiferina* and *Cladonia* agg. (**Table 2.5**). $[N]_{\text{lich}}$ in *C. rangiferina* was even marginally significantly negatively correlated with $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ in rain + snow (**Table 2.5**). By contrast $[N]_{\text{lich}}$ in *P. saxatilis* was significantly positively correlated with NO_3^- in rain and with $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ in rain (**Table 2.5**). There was no correlation of C:N_{lich} with any of N deposition or concentration variables in the *Cladonia* species (**Table 2.5**). However, in *P. saxatilis* C:N_{lich} was negatively correlated with NO_3^- in rain (significantly) and $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ in rain (marginally significantly), but positively correlated with NO_3^- in snow (**Table 2.5**). $[C]_{\text{lich}}$ was negatively correlated with $[\text{NH}_3]_{\text{air}}$ (*Cladonia* agg., *P. saxatilis*), NH_4^+ in rain or in snow (*Cladonia* agg.) and NH_4^+ in rain + snow (*Cladonia* agg., *C. rangiferina*; **Table 2.5**).

Table 2.5. Coefficients and levels of significance of the Spearman correlations between sites averages for $[N]_{\text{lich}}$, $[C]_{\text{lich}}$ or C:N_{lich} in the different species or group and the different forms of N deposition. Correlations with $P < 0.1$ are in bold. Stars indicate levels of significance: * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ and *** = $P < 0.001$.

	<i>Cladonia rangiferina</i>			<i>Cladonia</i> agg.			<i>Parmelia saxatilis</i>		
	$[N]_{\text{lich}}$	$[C]_{\text{lich}}$	C:N_{lich}	$[N]_{\text{lich}}$	$[C]_{\text{lich}}$	C:N_{lich}	$[N]_{\text{lich}}$	$[C]_{\text{lich}}$	C:N_{lich}
$[\text{NO}_2]_{\text{air}}$	-0.14	0.07	0.25	0.19	-0.12	-0.19	0.38	-0.26	-0.31
$[\text{NH}_3]_{\text{air}}$	-0.43	-0.57	0.5	-0.36	-0.71*	0.36	0.48	-0.86**	-0.36
NH_4^+ in rain	-0.5	-0.57	0.39	-0.29	-0.81*	0.29	0.17	-0.5	-0.07
NO_3^- in rain	0	-0.54	0.07	0.48	-0.48	-0.48	0.79*	-0.26	-0.71*
$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ in rain	0.04	-0.64	0	0.45	-0.55	-0.45	0.76*	-0.36	-0.67
NH_4^+ in snow	-0.5	-0.64	0.39	0.29	-0.71	-0.29	0.54	-0.5	-0.32
NO_3^- in snow	-0.36	0.23	0.18	-0.38	-0.09	0.38	-0.65	-0.02	0.77*
$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ in snow	-0.54	-0.11	0.32	-0.25	-0.39	0.25	-0.36	-0.18	0.54
NH_4^+ in rain + snow	-0.57	-0.75	0.5	0.18	-0.89**	-0.18	0.64	-0.64	-0.43
NO_3^- in rain + snow	-0.57	-0.25	0.36	0.25	-0.39	-0.25	0	0.07	0.18
$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ in rain + snow	-0.71	-0.43	0.54	0.07	-0.64	-0.07	0.18	-0.29	0.04

The relations potentially interesting for the biomonitoring were explored more thoroughly with linear regressions. They indicated that $[N]_{\text{lich}}$ in *P. saxatilis* could be explained by NO_3^- in rain and $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ in rain ($p < 0.001$, $R^2_{\text{adj}} > 0.9$) but that C:N_{lich} was less powerful in this purpose (**Figure 2.5**). $[C]_{\text{lich}}$ in *Cladonia* agg. could be explained by NH_4^+ in rain ($p < 0.01$, $R^2_{\text{adj}} = 0.650$; **Figure 2.7**), but the others relations between $[C]_{\text{lich}}$ and atmospheric N concentration (**Figure 2.6**) or deposition (**Figure 2.7**) appeared less robust in this purpose.

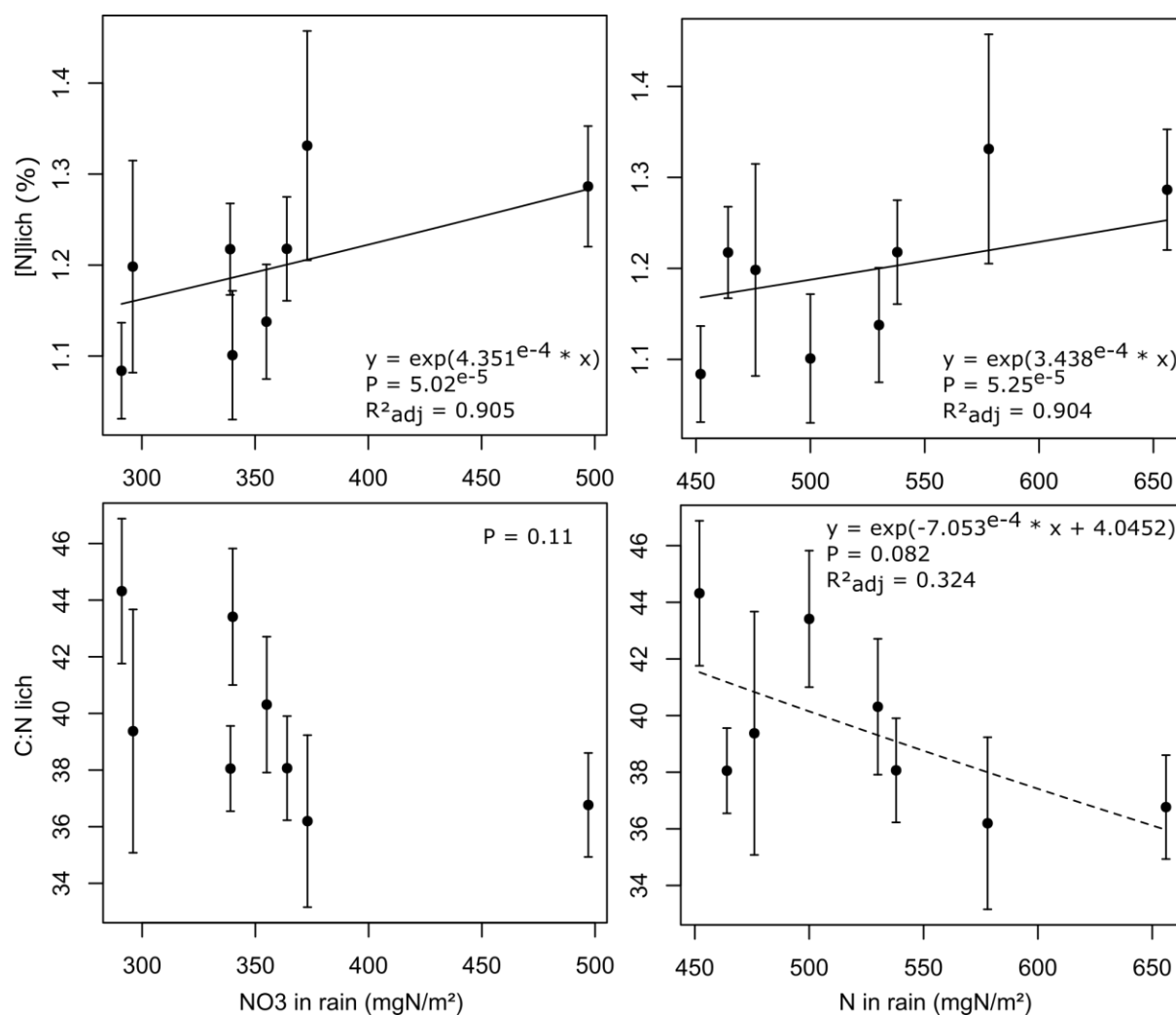


Figure 2.5. Relations between NO₃ or N (NO₃ + NH₄) deposition in rain and [N]_{lich} or C:N_{lich} in *P. saxatilis*. Error bars represent standard errors. Lines and text display the results of linear regressions.

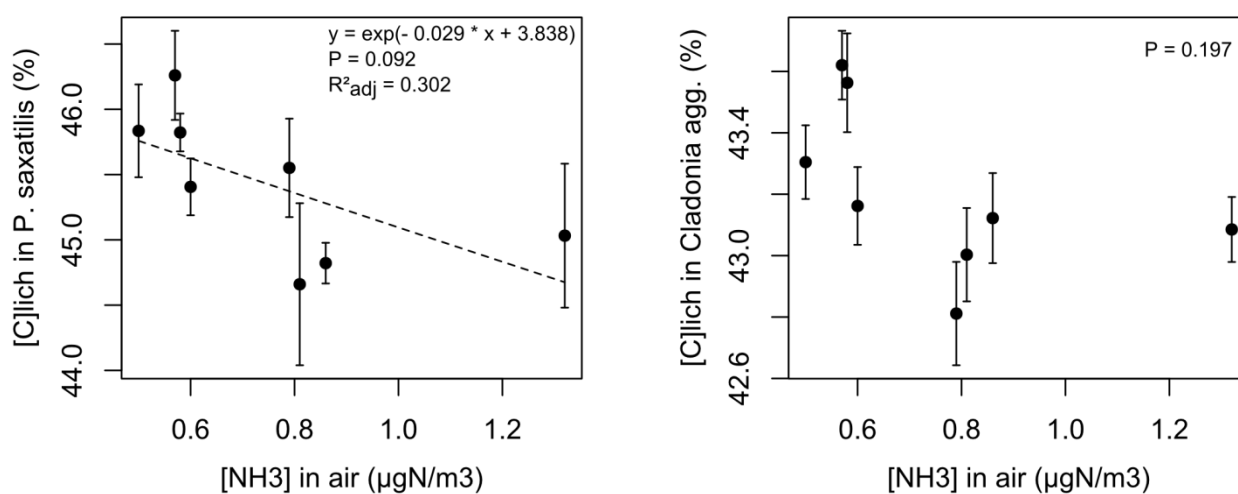


Figure 2.6. Relations between [NH₃] in air and [C]_{lich} in *P. saxatilis* and *Cladonia* agg. Error bars represent standard errors. Lines and text display the results of linear regressions.

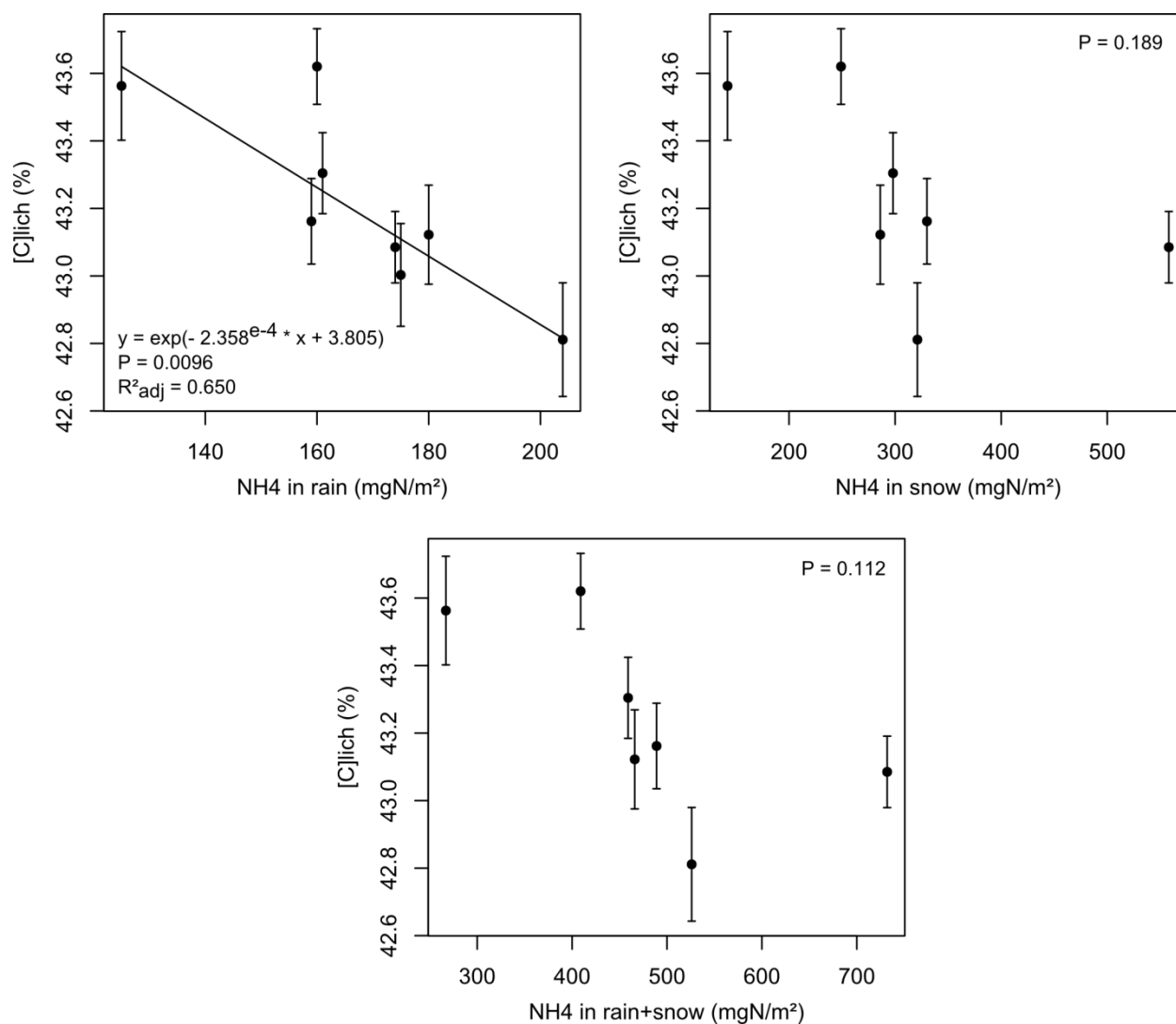


Figure 2.7. Relations between NH_4^+ in rain and/or in snow and $[C]_{lich}$ in *Cladonia* agg. Error bars represent standard errors. Lines and text display the results of linear regressions.

Finally, neither $[N]_{lich}$ nor $C:N_{lich}$ were correlated between the different species or groups (all Spearman correlation tests $P > 0.1$). On the contrary, $[C]_{lich}$ of the different species or group were significantly or marginally significantly positively correlated: *Cladonia rangiferina* with *Cladonia* agg. ($n = 7$, $\rho = 0.89$, $P = 0.01$), *Parmelia saxatilis* with *Cladonia rangiferina* ($n = 7$, $\rho = 0.71$, $P = 0.07$) and with *Cladonia* agg. ($n = 8$, $\rho = 0.71$, $P = 0.05$).

Discussion

This study aimed at testing the potential of N and C concentrations and C:N ratio in lichens thalli to biomonitor nitrogen deposition in a mountainous region receiving relatively low nitrogen amounts and presenting a narrow deposition range. For this purpose, N concentration in air was measured with passive gas samplers and N deposition with ion-exchange resin bulk collectors, which were the most adapted devices on remote sites. The use of ion-exchange resin limits the measurement bias that can occur through evaporation and bacterial/algal development in conventional water collectors, and the use of bulk rather than wet-only collectors should better approach the total amount of N received by the lichens. The method used to monitor deposition in snow (with collectors at the soil surface level) was designed to best approach N loads received by terricolous lichens (such as *Cladonia* spp.). N deposition was dominated by oxidized N forms but concentration in air was higher for NH_3 than for NO_2 . The gradient range (difference between the lowest and the highest values on our sites) was similar for the two deposition forms ($426 \text{ mg N m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ for NO_3^- deposition and $465 \text{ mg N m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ for NH_4^+ deposition) and the two gaseous forms ($0.75 \text{ } \mu\text{g N m}^{-3}$ for NO_2 and $0.82 \text{ } \mu\text{g N m}^{-3}$ for NH_3).

$[N]_{\text{lich}}$ and $C:N_{\text{lich}}$ in *Cladonia* species

The results revealed almost no correlation between $[N]_{\text{lich}}$ nor $C:N_{\text{lich}}$ in *Cladonia* species and the different forms of N deposition and when a relation was observed (with N deposition in rain + snow in *C. rangiferina*), it was marginally significant and surprisingly negative (**Table 2.5**).

Contrary to what can be found in northern latitudes, *Cladonia* species rarely form large homogenous mats on our sites but rather modest cushions (10-30cm) often imbricated with mosses, *Calluna vulgaris* or *Vaccinium myrtillus* shoots. Therefore, even if caution was taken to sample the center of the cushion it is still possible that the sampled podetions were exposed to some contamination by the surrounding vegetation. Terricolous lichens are also susceptible to contamination by livestock or wild animals. However, terricolous lichens from the group studied here have been shown not to be influenced by the soil surface beneath them (Ellis *et al.*, 2004). Other hypothesis explaining the absence of relation between $[N]_{\text{lich}}$ or $C:N_{\text{lich}}$ in *Cladonia* species and N deposition can be proposed: (i) the influence of local meteorological conditions, especially atmospheric humidity and the form and intensity of precipitation events (Nash III, 2008); (ii) the age of the sampled part of the thalli possibly varying across individuals depending on their growth rate driven by genetic background and local conditions and (iii) the disturbance of N

reallocation patterns by N deposition with less reallocation from the basis to the apex at higher deposition levels (Hyvärinen, 1997; Kytöviita & Crittenden, 2007). All together, these factors may induce intra- and inter-site variability, confusing the relation between N deposition and N concentration in sampled thalli of lichens. This relation might to be strong enough to emerge from these confounding factors in contexts of larger N deposition ranges (**Table 2.3**) but not in contexts of short gradients of low N deposition as in this study.

[N]_{lich} and C:N_{lich} in P. saxatilis

The results revealed significant correlations between $[N]_{\text{lich}}$ or $C:N_{\text{lich}}$ in the thallus of *P. saxatilis* and NO_3^- or $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ deposition in rain (**Table 2.5**). Only the relations including $[N]_{\text{lich}}$ rather than $C:N_{\text{lich}}$ appeared robust when tested as regressions (**Figure 2.5**).

P. saxatilis grows on a more standard substrate (rocks) than *Cladonia* species (often imbricated in vegetal cushions of different species), which might explain why *P. saxatilis* may have responded better to the N deposition gradient. However, it is to notice that $[N]_{\text{lich}}$ and $C:N_{\text{lich}}$ still presented a relatively high intra-site variability in this species. Some of the hypotheses proposed in the case of *Cladonia* species may also account for the variability in *P. saxatilis* $[N]_{\text{lich}}$ and $C:N_{\text{lich}}$ such as contamination by animals (birds), differences in the age of the thalli or perturbations in the internal nutrient fluxes (although less is known for this species). Saxicolous lichens are by far less represented than terricolous and epiphytic lichens in studies of biomonitoring of N deposition. This may be due to most of them being difficult to determine and/or to sample, or to the limited presence of suitable substrates in some regions. These results highlight their interest in our study region compared to the more classically used terricolous species.

However, *P. saxatilis* $[N]_{\text{lich}}$ or $C:N_{\text{lich}}$ did not appeared significantly correlated to N deposition in snow or to reduced N deposition alone. As they grow on the more or less vertical sides of large rocks, *P. saxatilis* thalli are expected to receive very different amounts of N through snow deposition than *Cladonia* spp. thalli or our sampling devices, which may explain the absence of correlation with N deposition in snow. N deposition being largely dominated by oxidized forms in the study region might explain why their relations with $[N]_{\text{lich}}$ or $C:N_{\text{lich}}$ in *P. saxatilis* were stronger than those of reduced N deposition.

$[C]_{\text{lich}}$ in *Cladonia* species and *P. saxatilis*

The lack of tight and reliable relations between N deposition and $[N]_{\text{lich}}$ or $C:N_{\text{lich}}$ seems to come more from variations in the lichen thalli than from N deposition measurements. Indeed, $[N]_{\text{lich}}$ and $C:N_{\text{lich}}$ were not correlated among species. Carbon concentration differences between sites were on the contrary more conserved across species and more significantly correlated (negatively) to N deposition than N concentration in the *Cladonia* species, especially with reduced N (**Table 2.5**). $[NH_3]_{\text{air}}$ was also significantly negatively correlated with $[C]_{\text{lich}}$ in *P. saxatilis* and *Cladonia* agg. (**Table 2.5**). However, only the relation of $[C]_{\text{lich}}$ in *Cladonia* agg. with NH_4^+ in rain appeared robust when tested as a regression (**Figure 2.6** and **Figure 2.7**).

Carbon concentrations are rarely reported in other studies, even when they were measured to calculate C:N ratios. However, we found one study (Munzi *et al.*, 2013) also reporting a negative trend between C concentration and N deposition in *Evernia prunastri* (an epiphytic lichen). Carbon concentration may be related to many different physiological processes and is thus generally difficult to interpret. However, we can hypothesize that such a relation can occur as either a consequence of toxic effects of reduced N on the lichen (van Herk *et al.*, 2003; Munzi *et al.*, 2012) or of an increase of photosynthesis accompanied by an increased concentration of sugars which would reduce the carbon mass content relatively to the oxygen mass content. However, we currently lack more information to discuss further the physiological responses that could have driven this result. These correlations still highlight that it might be interesting in future studies on the subject to consider more carefully C relations to see if this pattern can be confirmed.

Conclusion

These results suggest that $[N]_{\text{lich}}$ and $C:N_{\text{lich}}$ in *Cladonia* species could not be good biomonitors of N deposition in a context of short gradient of low level deposition. This contrasts with the results of Remke *et al.* (2009) which showed good relations between $[N]_{\text{lich}}$ in *Cladonia portentosa* and total wet N deposition ranging between 2.16 – 6.37 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ in dry coastal dunes of the Baltic sea. But on the contrary, our results are in line with those of Raymond *et al.* (2010) in the Strait of Georgia (a topographically complex area of British Columbia, western Canada) which highlighted the weakness of the relations between $[N]_{\text{lich}}$ in epiphytic lichens and N deposition over a short gradient (2.64 – 8.59 kg N ha⁻¹ yr⁻¹) whereas those relations were better at a larger geographical scale and over a longer N deposition gradient (1 – 25 kg N ha⁻¹ yr⁻¹).

$[N]_{\text{lich}}$ in *P. saxatilis*, more than $C:N_{\text{lich}}$, showed potential for biomonitoring NO_3^- deposition in rain only. This relation has the potential to help distinguish between the most contrasted NO_3^- rain deposition areas of the Pyrenees, but does not appear to be tight enough to distinguish at a higher resolution between sites receiving intermediate deposition.

It would be worth to look for and test other easy to sample and common saxicolous species to see if some could be better complementary biomonitors for NH_4^+ deposition. For the purpose of biomonitoring reduced N deposition, its links with the carbon content in lichens in general should also be explored further before being considered as a potential biomonitor.

N deposition in snow appears as the most difficult parameter to biomonitor. First, snow accumulation can be very variable spatially, resulting in heterogeneous N loads at the site scale. Moreover, if N absorption from snow meltwater have been shown to be efficient for some lichens (Crittenden, 1998), it might be dependent on the species and on local conditions (speed of the melt, importance of the water flux and its N concentration).

Overall, although some species could be promising to assess particular components of N deposition, none of the studied species appears to be a reliable biomonitor of total N deposition in this context.

Acknowledgments

We thank C. Coste for his help on lichen determination; E. Grzeskiewicz and S. Haunold for assistance with the field and lab work; V. Payre-Suc and F. Julien for performing colorimetry and elemental analyses. This work was funded by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME; ANEMONE project N° 1262C0013) and the region Midi-Pyrénées (ANEMONE project N° 11051284). This work was supported by the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

References

- Bassin, S., Volk, M. & Fuhrer, J. (2013) Species composition of subalpine grassland is sensitive to nitrogen deposition, but not to ozone, after seven years of treatment. *Ecosystems*, **16**, 1105–1117.
- Bassin, S., Volk, M., Suter, M., Buchmann, N. & Fuhrer, J. (2007) Nitrogen deposition but not ozone affects productivity and community composition of subalpine grassland after 3 yr of treatment. *The New phytologist*, **175**, 523–34.
- Bobbink, R., Hicks, K., Galloway, J., Spranger, T., Alkemade, R., Ashmore, M., Bustamante, M., Cinderby, S., Davidson, E., Dentener, F., Emmett, B., Erisman, J.-W., Fenn, M., Gilliam, F., Nordin, A., Pardo, L. & De Vries, W. (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological applications*, **20**, 30–59.

- Boutin, M., Lamaze, T., Couvidat, F., & Pornon, A. (2015) Subalpine Pyrenees received higher nitrogen deposition than predicted by EMEP and CHIMERE chemistry-transport models. *Scientific Reports*, **5**, 12942.
- Britton, A.J. & Fisher, J.M. (2010) Terricolous alpine lichens are sensitive to both load and concentration of applied nitrogen and have potential as bioindicators of nitrogen deposition. *Environmental pollution*, **158**, 1296–302.
- Cape, J.N., van der Eerden, L.J., Sheppard, L.J., Leith, I.D. & Sutton, M.A. (2009) Evidence for changing the critical level for ammonia. *Environmental pollution*, **157**, 1033–7.
- Clark, C.M. & Tilman, D. (2008) Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, **451**, 712–5.
- Crittenden, P. (1998) Nutrient exchange in an Antarctic macrolichen during summer snowfall–snow melt events. *New Phytologist*, 697–707.
- Crittenden, P.D. (1989) *Nitrogen relations of mat-forming lichens. Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi*, pp. 243–268. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dahlman, L., Persson, J., Palmqvist, K. & Näsholm, T. (2004) Organic and inorganic nitrogen uptake in lichens. *Planta*, **219**, 459–67.
- Ellis, C.C.J., Crittenden, P.D. & Scrimgeour, C.M. (2004) Soil as a potential source of nitrogen for mat-forming lichens. *Canadian Journal of Botany*, **82**, 145–149.
- Elser, J.J., Bracken, M.E.S., Cleland, E.E., Gruner, D.S., Harpole, W.S., Hillebrand, H., Ngai, J.T., Seabloom, E.W., Shurin, J.B. & Smith, J.E. (2007) Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, **10**, 1135–42.
- Fenn, M.E., Geiser, L., Bachman, R., Blubaugh, T.J. & Bytnerowicz, A. (2007) Atmospheric deposition inputs and effects on lichen chemistry and indicator species in the Columbia River Gorge, USA. *Environmental pollution*, **146**, 77–91.
- Frati, L., Brunialti, G., Gaudino, S., Pati, A., Rosamilia, S. & Loppi, S. (2011) Accumulation of nitrogen and changes in assimilation pigments of lichens transplanted in an agricultural area. *Environmental monitoring and assessment*, **178**, 19–24.
- Frati, L., Santoni, S., Nicolardi, V., Gaggi, C., Brunialti, G., Guttova, A., Gaudino, S., Pati, A., Pirintsos, S.A. & Loppi, S. (2007) Lichen biomonitoring of ammonia emission and nitrogen deposition around a pig stockfarm. *Environmental pollution*, **146**, 311–6.
- Galloway, J., Dentener, F. & Capone, D. (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 153–226.
- Gombert, S., Asta, J. & Seaward, M.R.D. (2003) Correlation between the nitrogen concentration of two epiphytic lichens and the traffic density in an urban area. *Environmental pollution*, **123**, 281–90.
- Van Herk, C., Mathijssen-Spiekman, E., de Zwart, D., Vanherk, C., Mathijssenspiekman, E. & Dezwart, D. (2003) Long distance nitrogen air pollution effects on lichens in Europe. *Lichenologist*, **35**, 347–359.
- Hogan, E.J., Minnullina, G., Sheppard, L.J., Leith, I.D. & Crittenden, P.D. (2010) Response of phosphomonoesterase activity in the lichen *Cladonia portentosa* to nitrogen and phosphorus enrichment in a field manipulation experiment. *New phytologist*, **186**, 926–33.
- Horswill, P., O’Sullivan, O., Phoenix, G.K., Lee, J.A. & Leake, J.R. (2008) Base cation depletion, eutrophication and acidification of species-rich grasslands in response to long-term simulated nitrogen deposition. *Environmental pollution*, **155**, 336–49.
- Hyvärinen, M. (1997) Modified element distributions in *Cladonia portentosa* as indices of acid and nitrogen deposition in the British Isles. Doctoral thesis, University of Nottingham.
- Hyvärinen, M. & Crittenden, P. (1998) Relationships between atmospheric nitrogen inputs and the vertical nitrogen and phosphorus concentration gradients in the lichen *Cladonia portentosa*. *New Phytologist*, **140**, 519–530.

- Johansson, O., Nordin, A., Olofsson, J. & Palmqvist, K. (2010) Responses of epiphytic lichens to an experimental whole-tree nitrogen-deposition gradient. *New Phytologist*, **188**, 1075–84.
- Knops, J.M.H., Nash III, T.H., Boucher, V.L. & Schlesinger, W.H. (1991) Mineral Cycling and Epiphytic Lichens: Implications at the Ecosystem Level. *Lichenologist*, **23**, 309–321.
- Krupa, S. V. (2003) Effects of atmospheric ammonia (NH₃) on terrestrial vegetation: a review. *Environmental Pollution*, **124**, 179–221.
- Kytöviita, M.-M. & Crittenden, P.D. (2007) Growth and nitrogen relations in the mat-forming lichens *Stereocaulon paschale* and *Cladonia stellaris*. *Annals of botany*, **100**, 1537–45.
- Lovett, G. & Kinsman, J. (1990) Atmospheric pollutant deposition to high-elevation ecosystems. *Atmospheric Environment*, **24A**, 2767–2786.
- Markert, B., Breure, A. & Zechmeister, H. (2003) *Bioindicators & Biomonitors, Principles, Concepts and Applications*, Elsevier. (ed. by B. Markert, A. Breure, and H. Zechmeister) Elsevier Science Ltd., Oxford.
- McMurray, J.A., Roberts, D.W., Fenn, M.E., Geiser, L.H. & Jovan, S. (2013) Using Epiphytic Lichens to Monitor Nitrogen Deposition Near Natural Gas Drilling Operations in the Wind River Range, WY, USA. *Water, Air, & Soil Pollution*, **224**, 1487.
- Munzi, S., Paoli, L., Fiorini, E. & Loppi, S. (2012) Physiological response of the epiphytic lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. to ecologically relevant nitrogen concentrations. *Environmental pollution*, **171**, 25–9.
- Munzi, S., Pisani, T., Paoli, L., Renzi, M. & Loppi, S. (2013) Effect of nitrogen supply on the C / N balance in the lichen *Evernia prunastri* (L .) Ach . *Turkish Journal of Biology*, **37**, 165–170.
- Nash III, T.H. (2008) *Lichen biology*, Second Edi. (ed. by T.H. Nash III) Cambridge University Press, Cambridge.
- Ochoa-Hueso, R., Mejías-Sanz, V., Pérez-Corona, M.E. & Manrique, E. (2013) Nitrogen deposition effects on tissue chemistry and phosphatase activity in *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd., a common terricolous lichen of semi-arid Mediterranean shrublands. *Journal of Arid Environments*, **88**, 78–81.
- Olsen, H.B., Berthelsen, K., Andersen, H.V. & Søbchting, U. (2010) *Xanthoria parietina* as a monitor of ground-level ambient ammonia concentrations. *Environmental pollution*, **158**, 455–61.
- Onipchenko, V.G., Makarov, M.I., Akhmetzhanova, A.A., Soudzilovskaia, N.A., Aibazova, F.U., Elkanova, M.K., Stogova, A. V. & Cornelissen, J.H.C. (2012) Alpine plant functional group responses to fertiliser addition depend on abiotic regime and community composition. *Plant and Soil*, **357**, 103–115.
- Payne, R.J., Dise, N.B., Stevens, C.J. & Gowing, D.J. (2013) Impact of nitrogen deposition at the species level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 984–7.
- Pearson, B.Y.J. & Stewart, G.R. (1993) The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytologist*, **125**, 283–305.
- Phoenix, G.K., Emmett, B.A., Britton, A.J., Caporn, S.J.M., Dise, N.B., Helliwell, R., Jones, L., Leake, J.R., Leith, I.D., Sheppard, L.J., Sowerby, A., Pilkington, M.G., Rowe, E.C., Ashmore, M.R. & Power, S.A. (2012) Impacts of atmospheric nitrogen deposition: responses of multiple plant and soil parameters across contrasting ecosystems in long-term field experiments. *Global Change Biology*, **18**, 1197–1215.
- Phoenix, G.K., Hicks, W.K., Cinderby, S., Kuylenstierna, J.C.I., Stock, W.D., Dentener, F.J., Giller, K.E., Austin, A.T., Lefroy, R.D.B., Gimeno, B.S., Ashmore, M.R. & Ineson, P. (2006) Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology*, **12**, 470–476.

- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. Available at: <http://www.r-project.org>. (Accessed: 29th September 2014).
- Raymond, B.A., Bassingthwaite, T. & Shaw, P.D. (2010) Measuring nitrogen and sulphur deposition in the Georgia Basin, British Columbia, using lichens and moss. *Journal of Limnology*, **69**, 22–32.
- Remke, E., Brouwer, E., Kooijman, A., Blindow, I., Esselink, H. & Roelofs, J.G.M. (2009) Even low to medium nitrogen deposition impacts vegetation of dry, coastal dunes around the Baltic Sea. *Environmental pollution*, **157**, 792–800.
- Root, H.T., Geiser, L.H., Fenn, M.E., Jovan, S., Hutten, M.A., Ahuja, S., Dillman, K., Schirokauer, D., Berryman, S. & McMurray, J.A. (2013) A simple tool for estimating throughfall nitrogen deposition in forests of western North America using lichens. *Forest Ecology and Management*, **306**, 1–8.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M. & Wall, D.H. (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, **287**, 1770–4.
- Sheppard, L.J., Leith, I.D., Crossley, A., Dijk, N. Van, Cape, J.N., Fowler, D. & Sutton, M.A. (2009) *Long-Term Cumulative Exposure Exacerbates the Effects of Atmospheric Ammonia on an Ombrotrophic Bog: Implications for Critical Levels*. *Atmospheric Ammonia: Detecting Emission Changes and Environmental Impacts* (ed. by M.A. Sutton, S. Reis, and S.M. Baker), pp. 49–58. Springer.
- Stevens, C.J., Duprè, C., Dorland, E., Gaudnik, C., Gowing, D.J.G., Bleeker, A., Diekmann, M., Alard, D., Bobbink, R., Fowler, D., Corcket, E., Mountford, J.O., Vandvik, V., Aarrestad, P.A., Muller, S. & Dise, N.B. (2010) Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. *Environmental pollution*, **158**, 2940–5.
- Susfalk, R. & Johnson, D. (2002) Ion exchange resin based soil solution lysimeters and snowmelt solution collectors. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **33**, 1261–1275.
- Vingiani, S., Adamo, P. & Giordano, S. (2004) Sulphur, nitrogen and carbon content of *Sphagnum capillifolium* and *Pseudevernia furfuracea* exposed in bags in the Naples urban area. *Environmental Pollution*, **129**, 145–158.

Chapitre 3
Réponses de la végétation des pelouses
subalpines pyrénéennes aux dépôts
azotés et au changement climatique au
cours des 60 dernières années

3.1. Contexte et résumé

Les dépôts atmosphériques azotés et le changement climatique sont deux composantes majeures du changement global agissant sur la biodiversité (Sala *et al.*, 2000). Les émissions d'azote réactif dans l'atmosphère ont fortement augmenté depuis le début de l'ère industrialisée, de même que celles de dioxyde de carbone (CO₂) à l'origine, entre autres, du changement climatique. La plupart des écosystèmes sont donc exposés depuis plusieurs décennies à la fois au changement climatique et à l'augmentation des dépôts azotés. Plusieurs études empiriques ont confirmé que chacune de ces composantes du changement global avait eu un impact sur les écosystèmes et leurs communautés végétales (voir e.g. pour des milieux proches des pelouses subalpines étudiées : Duprè *et al.*, 2010; Gottfried *et al.*, 2012; Pauli *et al.*, 2012; Stevens *et al.*, 2004b). Cependant, la contribution simultanée des dépôts azotés et du changement climatique (que ce soit de façon compensatoire, additive ou interactive) aux changements observés dans ces communautés végétales a rarement été explicitement considérée dans une même étude.

Dans ce chapitre, nous étudions les effets combinés des dépôts azotés et du changement climatique sur les pelouses acides subalpines dans les Pyrénées au cours des 60 dernières années. Pour ce faire, nous avons combiné deux approches complémentaires. La première repose sur l'analyse de 553 relevés floristiques historiques réalisés au cours des 60 dernières années. Elle vise à détecter la réponse des communautés végétales (richesse et composition) le long des gradients climatiques et de cumul de dépôts azotés. La seconde approche repose sur le ré-échantillonnage en 2013-2014 de 40 sites et la comparaison avec leurs relevés historiques homologues. Elle vise à détecter les changements de richesse et de composition des communautés entre les deux périodes d'échantillonnage.

Nos résultats montrent des effets positifs et additifs du cumul de dépôts azotés et de l'augmentation des températures sur la richesse spécifique en plantes vasculaires. Ces changements environnementaux ont conduit à une modification des pelouses subalpines vers des communautés plus thermophiles et mésotrophes. Aucune acidification des sols ou forte compétition pour la lumière en réponse aux dépôts azotés n'ont été détectées. Ainsi, contrairement à ce qui a été observé dans les prairies acides de plaine, le cumul des dépôts azotés n'a pas conduit ces dernières décennies dans les pelouses subalpines à une perte majeure de biodiversité via des processus d'acidification et d'eutrophisation. Au contraire, l'action combinée du changement climatique et du cumul de dépôts azotés a contribué à réduire les contraintes abiotiques de ces habitats (faibles températures et oligotrophie), favorisant

l'installation locale d'espèces moins stress-tolérantes à un taux plus rapide que celui de l'extinction locale d'espèces. Ces changements ont cependant conduit à une homogénéisation de ces communautés à l'échelle des Pyrénées.

3.2. Article: Nitrogen deposition and climate change increased vascular plant species richness and altered the composition of subalpine grasslands

Marion Boutin^{1,2}, Emmanuel Corcket³, Didier Alard³, Luis Villar⁴, Juan-José Jiménez⁴, Cian Blaix⁵, Cédric Lemaire³, Gilles Corriol⁶, Thierry Lamaze² and André Pornon¹.

¹Université Toulouse 3 Paul Sabatier, CNRS, ENFA, UMR5174 Laboratoire Evolution & Diversité Biologique, 118 route de Narbonne F-31062 Toulouse, France; marionboutin@free.fr, andre.pornon@univ-tlse3.fr

²Centre d'Etudes Spatiales de la BIOSphère, F-31401 Toulouse, France; thierry.lamaze@cesbio.cnes.fr

³Université de Bordeaux, INRA, UMR1202 BIOGECO, Allée Geoffroy St-Hilaire, F-33615 Pessac, France; emmanuel.corcket@u-bordeaux1.fr, didier.alard@u-bordeaux.fr, cedric.lemaire@pierroton.inra.fr

⁴ Instituto Pirenaico de Ecología, IPE-CSIC, Avda. Nuestra Señora de la Victoria 12, E-22700 Jaca (Huesca), Spain; lvillar@ipe.csic.es, jjimenez@ipe.csic.es

⁵Institute of Life Sciences, Scuola Superiore Sant'Anna, Piazza Martiri della Libertà 33, I-56127 Pisa, Italy; c.blaix@sssup.it

⁶Conservatoire Botanique National Pyrénées Midi-Pyrénées (CBNPMP), Vallon de Salut, BP 70315, F-65203 Bagnères-de-Bigorre, France; gilles.corriol@cbnpmp.fr

Corresponding author: marionboutin@free.fr

ABSTRACT

Aim

Atmospheric nitrogen (N) deposition and climate change are two major components of global change driving species richness and composition in plant communities. However, their interacting effects have insufficiently been investigated, especially in high-elevation cold- and nutrient- limited ecosystems. This study investigates the combined impact of N deposition and climate changes in subalpine acidic grasslands over the past 60 years.

Location

Pyrenean massif (southwest Europe).

Methods

Two complementary approaches were set up, using 553 vegetation “historical” relevés surveyed over the last 60 years among which 40 sites were re-visited in 2013 and 2014. The first approach aimed to detect changes in grasslands communities along ecological gradients including temperature and N deposition while the second approach focused mainly on the temporal changes induced by these factors over the past decades.

Results

Overall, the increase of both temperature and cumulative N deposition had positive and additive effects on vascular species richness and changed the species composition toward more thermophilic and mesotrophic communities. We found no evidence of significant soil acidification or strong competition for light associated with N deposition, in contrast to lowland grasslands where N deposition is commonly related to a decrease of plant richness.

Main conclusions

Our findings suggest that both cumulative N deposition and climate warming reduced the abiotic constraints in these habitats, allowing less stress-tolerant species to establish at a faster rate than local species are lost.

INTRODUCTION

Mountains constitute hot spots of biodiversity throughout the world. Global warming and atmospheric nitrogen (N) deposition are among the main potential global changes threatening this diversity. Indeed, low temperatures and nitrogen availability chiefly limit the functioning of most high elevation ecosystems (Körner, 1999). In Europe, decadal average temperature increased by approximately 1.3°C (\pm 0.11°C) since pre-industrial times, with particularly important warming in mountainous regions (Füssel *et al.*, 2012). Meanwhile, atmospheric N deposition also considerably increased (on a global basis, from 34 Tg N yr⁻¹ in 1860 to 100 Tg N yr⁻¹ in 1995) and is expected to pursue its increase in the future at a global scale (Galloway *et al.*, 2008). Although more distant from the main N emissions sources than many low elevation habitats, most European high-elevation habitats receive rates of N deposition several times higher than presumed pre-industrial levels (Hiltbrunner *et al.*, 2005), and are susceptible to exceed their critical loads currently estimated at 5-10 kgN ha⁻¹ yr⁻¹ (Bobbink *et al.*, 2010; Phoenix *et al.*, 2012).

High-elevation cold habitats are expected to respond markedly to temperature increase. Pauli *et al.* (2012) revealed an increase of plant diversity with temperature elevation in European mountains (with the exception of Mediterranean mountain regions).. However, other studies reported either no (Price & Waser, 2000; Spasojevic *et al.*, 2013; Windmaïßer & Reisch, 2013) or weak (Vittoz *et al.*, 2009) directional changes in diversity and composition. Finally, in drier mountain regions, a decrease of diversity with climate change was observed (Sebastià *et al.*, 2008b; Pauli *et al.*, 2012). While effects of local factors (grazing or habitat heterogeneity) or changes in precipitation amounts have been suggested to explain the divergent responses of these habitats to climate change, potential effects of N deposition have rarely been considered.

Study of the impacts of atmospheric N deposition on lowland acidic grasslands showed an overall negative effect on plant diversity and composition (Stevens *et al.*, 2004; Duprè *et al.*, 2010; Maskell *et al.*, 2010; Gaudnik *et al.*, 2011; Phoenix *et al.*, 2012). However, the response of high elevation plant communities to N deposition has been much seldom investigated and our current understanding comes almost exclusively from field manipulation simulating N deposition. These experiments revealed an increase of biomass and changes in the proportion of species in response to N addition (Bowman *et al.*, 1993; Bassin *et al.*, 2007, 2012, 2013; Onipchenko *et al.*, 2012). Such experimental studies are essential to understand the processes underlying the effects of N addition. However, they may not account for the potential impact of long-term chronic accumulation of N deposition on plant communities, and

especially on those exposed to low deposition rates that may yet display a larger response per unit of added N (Clark & Tilman, 2008; Remke *et al.*, 2009; Stevens *et al.*, 2010; Phoenix *et al.*, 2012).

Few studies combined the investigation of the effects on grasslands of both these components of global change. In lowland acidic grasslands, Gaudnik *et al.* (2011) highlighted that N deposition was related to significant community composition change at the regional scale whereas climate change was the predominant driver at a larger scale. Experimental studies in a temperate grasslands (Zavaleta *et al.*, 2003; Hutchison & Henry, 2010) revealed no interactive effects of N deposition and climate, but simple opposite or additive effects on species diversity or vegetation productivity respectively. But we are aware of no field surveys that would have studied in subalpine grasslands the effects of both climate change and N deposition across large spatial and/or temporal gradients.

Here we address this question on the subalpine semi-natural acidic grasslands of the Pyrenees (southwest Europe), using two complementary approaches. In the first approach we analyzed 553 plots surveyed over 60 years across the entire Pyrenees' massif. This approach already used in northern Europe acidic grasslands (Duprè *et al.*, 2010) allows the exploration of large spatial and temporal environmental gradients to detect the effects of cumulative N deposition and climate change on plant communities. However, this approach has the inconvenience of not always allowing separation of temporal or spatial causes of vegetation changes. This could be especially problematic in mountainous areas where the altitudinal component of the spatial gradient has a very strong influence on vegetation. Consequently, we also used a re-sampling approach based on the comparison of historical (between 1948 and 1986) and recently (2013-2014) re-sampled vegetation records at forty fixed locations. This approach was fruitfully used in previous studies (Gaudnik *et al.*, 2011) and allows to separate the temporal changes from the spatially driven differences and thus to ease ecological interpretation.

We especially addressed the following questions: Did plant species richness and composition of subalpine grasslands change over the past decades? Can these changes be related to cumulative N deposition and/or climate change? And if yes, how did these two components of global change influence the species richness and composition of subalpine grasslands?

METHODS

Investigation of 60 years of field survey studies

Vegetation data

We compiled 839 relevés belonging to the *Nardion strictae* Br.-Bl. 1926 *sensu lato* community type covering a period from 1948 to 2010 and most of the Pyrenees subalpine area (Table S1 and Figure S1 in Supporting Information). These extensively grazed, acidic, oligotrophic and widespread grasslands are dominated by *Nardus stricta*, *Festuca eskia*, *Festuca nigrescens* and *Trifolium alpinum*. This vegetation type shares edaphic and floristic attributes with the low elevation alliance *Violion caninae* Schwick. 1944, on which the effects of nitrogen deposition have been well studied in Europe (Stevens *et al.*, 2004, 2010, 2011; Duprè *et al.*, 2010; Gaudnik *et al.*, 2011). Because many relevés lacked information about bryophytes and lichens, only vascular plants were accounted for in this study (see Appendix 1 for more taxonomic information). The abundance coefficients of all the relevés were lined up with the Braun-Blanquet scale (Braun-Blanquet, 1932).

In order to limit the influence of confounding factors (for example, potential shift in phytosociologists' sampling preference for a given community type to another; Chytrý *et al.*, 2014), we centered the dataset on a relatively homogeneous floristic group. For this purpose, we ran two successive correspondence analyses (CA) followed by hierarchical classifications on the CA coordinates which led to the exclusion of 197 relevés corresponding to atypical hygrophilous grasslands or grasslands largely dominated by the grass *Festuca eskia* and unequally sampled spatially and temporally in the dataset.

Environmental data

Latitude (*Lat*) longitude (*Lon*) coordinates (mentioned by the author or completed from location information provided) and values for elevation (*Elev*, in meters), slope (*Slope*, in degrees) and aspect were attributed to each relevé. Aspect was coded along the North-South axis (*NSasp*, from -4, North, to 4, South) and along the West-East axis (*WEasp*, from -4, West, to 4, East). The vegetation cover (*Cover*, in %) and plot size were not mentioned for all the relevés. When the plots sizes were mentionned we did not find any positive correlation with species richness (Spearman correlation test, $p = 0.203$, $n = 430$) likely because phytosociologists generally tended to adjust the plot size to the minimal area of the community and even to extend

this plot size in particularly species-poor communities (Chytrý, 2001). For these reasons, plot size was not accounted for in the analyses.

For each site, we calculated community indexes for edaphic moisture (F_{ci}), soil pH (R_{ci}), soil fertility (N_{ci}), community thermophily (T_{ci}) and heliophily (L_{ci}) as the mean (not cover-weighted) of species F , R , N , T and L indicator values derived from Ellenberg *et al.* (1992) but adapted to the French context and completed by Julve (1998).

Plant communities were expected to respond to the chronic accumulation of low N deposition. We calculated cumulative N deposition amounts ($CumN$, in mg/m²) from 1940 to the sampling year for each site from modeled estimations of N deposition from the CHIMERE chemistry-transport model (Menut *et al.*, 2013) and trends in N pollutant emissions over years from the CITEPA (French Interprofessionnal Technical Center for the Study of Atmospheric Pollution) and Erisman *et al.* (2007). See Appendix S1 for more detailed information on this calculation.

Temperature and precipitation data were compiled from the French SAFRAN dataset (grid of 8×8 km, 1958-2013; Quintana-Seguí *et al.*, 2008) and the Spanish SPAIN02 v2.1-March 2012 dataset (grid of 20×20 km, 1950-2007; Herrera *et al.*, 2012). See Appendix S1 for more details on these data. Temperature was corrected for site elevation according to the adiabatic gradient of -0.56°C by 100 m of elevation. Since vegetation was expected to respond to both present and to some extent to past climatic conditions, we calculated the average of the annual mean temperature ($Tmean$) and of the annual cumulative precipitation ($Prcp$) over the 8 years before the year of sampling (included) for each plot.

Statistical analysis

This first approach aimed at identifying the variations in species richness and composition along large gradients of both temperature and cumulative N deposition. To avoid issues of multicollinearity, the geographical (Lat , Lon , $Elev$) and temporal ($Year$) variables behind these gradients were not included in the models as explanatory or constraining variables since they were correlated to $Tmean$, $Prcp$ and $CumN$. Variables included in the subsequent analyses were $Slope$, $NSasp$, $WEasp$, $Tmean$, $Prcp$ and $CumN$. A total of 89 plots were excluded from the analyses as they lacked values for at least one of these variables, resulting in the final analyzed dataset of 553 plots.

A generalized additive model (GAM), accounting for non-linear responses, was used to explore the effects of the explanatory variables on species richness. A Poisson distribution was

used with a correction for overdispersion (Quasipoisson). Soil characteristics are important local determinants of species richness. In the absence of measured data, communities' indexes R_{ci} , N_{ci} and F_{ci} were included as explanatory variables as surrogates for, respectively, soil pH, fertility and moisture. Because we have selected plots in a relatively homogeneous community type, the use of these indexes in regression with species richness should not be subjected to important bias (Zelený & Schaffers, 2012). A backward selection of the variables was applied according to their significance.

A redundancy analysis (RDA, a constrained ordination method) on Hellinger transformed species data was used to explore effects of environmental drivers on species composition. The constraining variables were *Slope*, *NSasp*, *WEasp*, *Tmean*, *Prcp* and *CumN*. *Lat*, *Long*, *Elev* and *Years* were projected *a posteriori*, as no constraining variables. The significance of both variable types in explaining species composition was tested by a permutation tests (999 permutations). Contrary to analyses on species richness, analyses on species composition are subjected to important bias in the use of community indexes. These indexes (F_{ci} , R_{ci} , N_{ci} , T_{ci} and L_{ci}) were thus here projected *a posteriori* using a modified permutation test (999 permutations) which accounts for the fact that mean ecological community's indexes always inherit information on compositional similarity (Zelený & Schaffers, 2012).

Comparison of historical vs recently re-sampled relevés

Sites selection

In 2013 and 2014 summers we re-sampled 40 sites across the Pyrenean subalpine belt (Fig. S1 and Table S2). Sites were selected according to the age of the relevés (older than 1987), the presence of sufficiently detailed information about location (toponymy, altitude, slope and aspect) and the presence of four species from the following list: *Nardus stricta*, *Festuca eskia*, *Festuca nigrescens* agg., *Jasione* sp., *Plantago alpina*, *Calluna vulgaris*, *Luzula pediformis*, *Potentilla erecta*, *Campanula scheuchzeri* agg., *Agrostis capillaris*, *Avenella flexuosa*, *Polygala* sp., and *Galium saxatile*. We used the same methodology as for the historical relevés to calculate *Tmean*, *Prcp* and *CumN* for the recent relevés.

Re-sampling protocol

The protocol was adapted from Gaudnik *et al.* (2011). We surveyed the community the closest to the historical one (belonging to the *Nardion strictae* alliance and containing at least four species among those of the above list) at the location indicated by the author. Eight 2 m²

quadrats were randomly defined in a relatively topographically and floristically homogeneous area. Boggy or woody areas, tracks/paths or particular microtopographic elements (rocks contour, holes...) were avoided when placing quadrats. In each site we measured the average vegetation height and cover, and we recorded grazing clues (presence of herds around, animal droppings, grazed vegetation) and attributed one out of three levels of grazing intensity (none, moderate, intensive). On each quadrat we identified all vascular plant species and estimated their cover from 1 to 10 according to the domin scale (see Rich *et al.*, 2005). These covers were later lined up with the phytosociological scale (Braun-Blanquet, 1932) for comparison with the historical data. At the centre of five quadrats randomly selected among the eight we took a soil sample at 0 - 15 cm and pooled the five samples of the site. Soil samples were then air dried and sieved at 2 mm. Subsamples were used for the measurement of pH in water and the analysis of C and N contents (CHONS Thermo Electron FlashEA1112) after fine milling (Retsch MM200).

Statistical analysis

Comparisons of means between the historical and recent groups of relevés were performed for explanatory variables (*Tmean*, *Prcp* and *CumN*) and plant community characteristics: species richness (*S*), Simpson dissimilarity (*D*) and community indexes (F_{ci} , R_{ci} , N_{ci} , T_{ci} and L_{ci}). One-tailed paired Student tests were used for *S*, *Tmean*, N_{ci} (after square-root transformation), T_{ci} and L_{ci} and a two-tailed paired Student test was used for R_{ci} after checking for normality and equality of the variances. Variables for which these assumptions could not be met even after transformations (*Prcp*, *CumN* and F_{ci}) were tested by non parametric one-tailed paired Wilcoxon rank sum tests. Simpson dissimilarity indexes (*D*) were calculated for each pair of sites within the historical group on one side and the recent group on the other side (see Appendix S1 for the formula). As the data obtained lacked independence, mean historical and mean recent *D* were compared with a permutation test (1000 permutations).

A Correspondence Analysis (CA), an unconstrained ordination, was used to explore the species compositional trajectories of the communities between the two dates, after downweighting of the species present in less than 5% of the sites. Two-tailed paired Wilcoxon tests were used to assess the significance of the shifts in sites' coordinates between historical and recent relevés along the first two axes. Spearman correlations tests were used to measure the correlations of environmental variables with each of the first two axes. For this purpose, the grazing intensity was coded as: 0 = no grazing, 1 = moderate grazing and 2 = intensive grazing. The significance of the projection of the community indexes in the first plan was tested by the modified permutations test (999 permutations; Zelený & Schaffers, 2012).

Finally, we calculated the change in frequency of species occurrence (Δ freq.) between the historical and the recent pools of relevés. We recorded ecological values and altitudinal ranks (Gottfried *et al.*, 2012) only for the species with a Δ freq. strictly exceeding 0.1 in absolute value (*i.e.* if the difference of occurrence was of more than 4 sites), thus limiting the risk of over interpretation.

RESULTS

Investigation of 60 years of field survey studies

Species richness

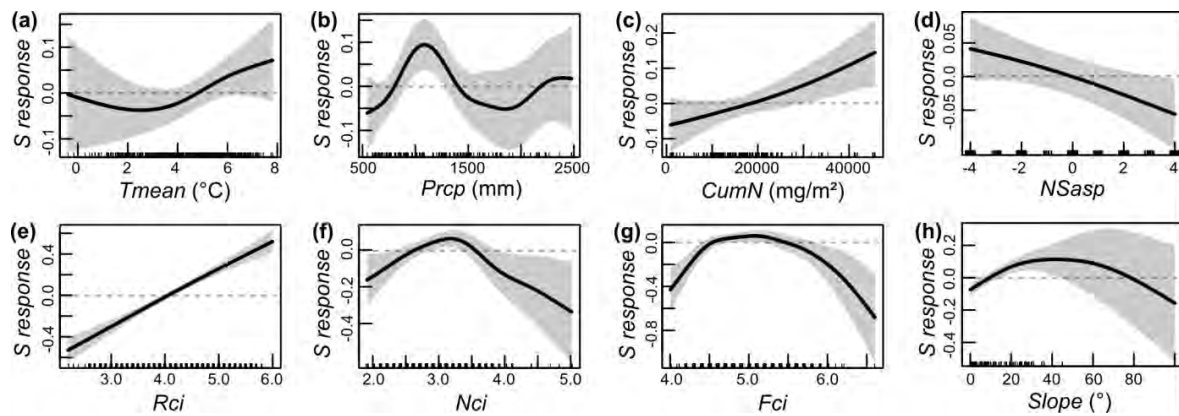


Figure 3.1. Relationships between species richness and each significant explanatory variable of the Generalized Additive Model (holding all the other explanatory variables constant). *S response* represents the deviation from mean species richness. The dashed line indicates the *S response* = 0 line. Grey zones are 95% confidence intervals. Ticks on the x axes show jittered values actually taken by the variables in the dataset. *Tmean* = mean temperature; *Prcp* = precipitation; *CumN* = cumulative N deposition; *NSasp* = North-South aspect; *Rci*, *Nci* and *Fci* = community indexes for soil pH, fertility and moisture respectively.

Over the 553 sites analyzed, a total of 544 species were recorded. The mean (\pm sd) number of species per site was 20.9 (\pm 8.5). The GAM explained 48.1% of the deviance in species richness with a R^2_{adj} of 0.46. *Rci* (edf = 1.30, F = 13.13, p < 0.001), *CumN* (edf = 1.36, F = 1.11, p < 0.001) and *Tmean* (edf = 1.51, F = 0.54, p = 0.028) had a positive effect on species richness (**Figure 3.1a,c,e**) while *NSasp* had a negative effect (edf = 1.06, F = 0.78, p = 0.008; **Figure 3.1d**) and *WEasp* no significant effect. The model suggests an additive effect of both *CumN* and *Tmean* on richness as they had together a greater effect than each of them considered individually had (**Figure 3.2**). The species richness had a curved relationship with *Nci* (edf = 3.24, F = 2.43, p < 0.001), *Fci* (edf = 3.97, F = 3.37, p < 0.001), and *Slope* (edf = 1.92, F = 2.39, p < 0.001), *i.e.* the highest richness was observed for the intermediate values of these

explicative variables (**Figure 3.1f-h**). Species richness had a significant non linear relationship with *Prcp* ($\text{edf} = 4.14$, $F = 1.69$, $p = 0.002$) with a peak for annual precipitation around 1100 mm (**Figure 3.1b**).

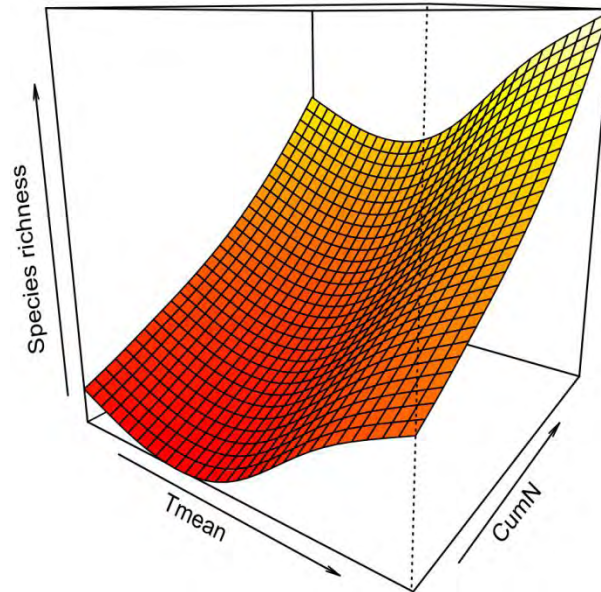


Figure 3.2. Relationship between species richness and both mean temperature and cumulative N deposition (holding all the other explanatory variables constant) as predicted by the Generalized Additive Model.

Species composition

All the explanatory variables tested were significant (permutation test of the RDA, $P = 0.01$ for *Slope*, *NSasp*, *Tmean*, *Prcp*, *CumN* and $P = 0.03$ for *WEasp*) in explaining species composition. These variables together constrained 9.9% of the variance in species composition. The first two axes were significant ($P = 0.005$, permutation test) and explained respectively 60.6% and 18.2% of the constrained variance. Permutation test of the *a posteriori* projections of the variables *Years*, *Lat*, *Lon* and *Elev* on the first two axes showed their significance ($P = 0.001$ for all variables). Modified permutation test of the *a posteriori* projections of the community indexes variables showed that L_{ci} ($P = 0.032$), T_{ci} ($P = 0.001$), F_{ci} ($P = 0.065$), R_{ci} ($P = 0.003$), N_{ci} ($P = 0.031$) but not F_{ci} ($P = 0.065$) were significantly correlated to the first plan of the RDA. On the first two axes, climatic variables (*Tmean* and *Prcp*) and cumulative N deposition (*CumN*) appeared as the most important variables explaining species composition. *Tmean* was mainly linked to the altitudinal gradient (*Elev*) and to *Years*, *Prcp* to the geographical gradient (*Lat*, *Lon*), while *CumN* was related to both the geographical gradient and *Years* (**Figure 3.3a**).

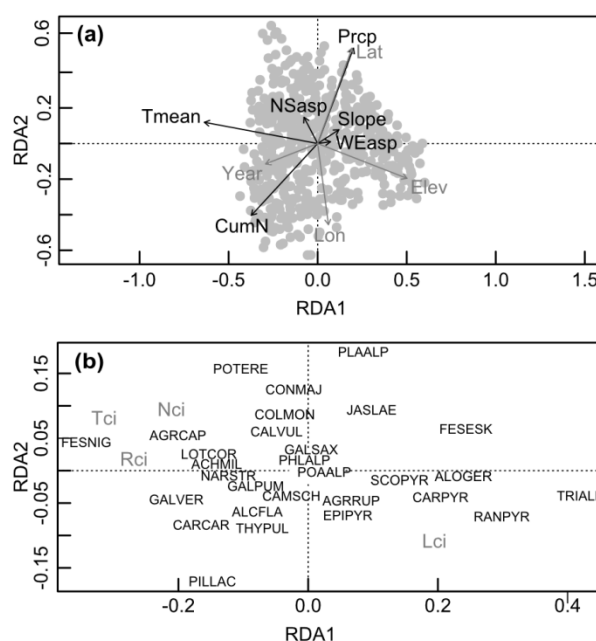


Figure 3.3. Redundancy analysis ordination bi-plots on the first two axes. (a) displays sites, constraining variables (in black) and *a posteriori* projected years and geographical variables (in grey). (b) displays species (selected among the most abundant species and to allow the reading of all the displayed labels) and *a posteriori* projected mean ecological indexes (in grey). See Appendix S2 for a list of the species acronyms. On each graph, only the significant *a posteriori* projected variables are shown. *Tmean* = mean temperature; *Prcp* = precipitation; *CumN* = cumulative N deposition; *NSasp* = North-South aspect; *WEasp* = West-East aspect; *L_{ci}*, *T_{ci}*, *R_{ci}* and *N_{ci}* = community indexes for heliophily, thermophily, soil pH and fertility respectively.

The first axis was a gradient of temperature (*Tmean*) and, to a lesser extent, of cumulative N deposition (*CumN*) (**Figure 3.3a**). The community indexes for soil pH (*R_{ci}*), soil fertility (*N_{ci}*) and thermophily (*T_{ci}*) were negatively related to this axis while the community index for heliophily (*L_{ci}*) was positively related to it (**Figure 3.3b**). Among the species, *Festuca nigrescens* agg., *Agrostis capillaris*, *Galium verum*, *Carex caryophyllea*, *Lotus corniculatus*, *Achillea millefolium* and *Pilosella lactucella* were found at the left extreme of the first axis while *Trifolium alpinum*, *Ranunculus pyrenaicus*, *Festuca eskia*, *Alopecurus gerardi*, *Carex pyrenaica* and *Scorzoneroides pyrenaica* were found at the right extreme of this axis (**Figure 3.3b**). Therefore, the species on the left side were associated to higher temperature, soil fertility, pH and cumulative N deposition, while the species on the right side were more characteristic of cooler, infertile, more acidic but sunnier conditions.

The second axis was mainly negatively related to *CumN* and positively to *Prcp* (**Figure 3.3a**). Thus *Pilosella lactucella*, *Thymus pulegioides*, *Carex caryophyllea*, *Epikeros pyrenaicus* and *Alchemilla flabellata* were typical of sites receiving higher levels of cumulative N deposition and lower levels of precipitation, while *Plantago alpina*, *Potentilla erecta*, *Conopodium majus*,

Jasione laevis and *Colchicum montanum* were associated with sites receiving lower levels of cumulative N deposition and higher levels of precipitation (**Figure 3.3b**).

Comparison of historical vs recently re-sampled relevés

Species richness and homogeneity

Table 3.1. Mean (\pm sd) of the environmental, vegetation structure and ecology variables for the historical and recent groups of relevés, and the significance of the shift of these variables between the two periods. Parametric paired Student tests were used for *S* (species richness), *Tmean* (mean temperature), *N_{ci}*, *T_{ci}* and *L_{ci}* (community indexes for heliophily thermophily, soil pH and fertility respectively). Non parametric paired Wilcoxon rank sum tests were used for *Prpc* (precipitation), *CumN* (cumulative N deposition) and *F_{ci}* (community index for soil moisture). A permutation test was used for *D* (Simpson dissimilarity).

Variable	Historical	Recent	p-value
Environmental factors			
<i>Tmean</i> (°C)	4.5 \pm 1.1	5.6 \pm 1.2	< 0.001
<i>Prpc</i> (mm)	1409 \pm 471	1303 \pm 445	< 0.001
<i>CumN</i> (mg/m ²)	11263 \pm 5416	31425 \pm 7081	< 0.001
Vegetation structure			
<i>S</i>	21.4 \pm 6.9	35.2 \pm 9.5	< 0.001
<i>D</i>	0.7 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	< 0.001
Vegetation ecology			
<i>L_{ci}</i>	7.5 \pm 0.3	7.4 \pm 0.3	0.261
<i>T_{ci}</i>	3.7 \pm 0.5	3.9 \pm 0.5	0.007
<i>F_{ci}</i>	5.0 \pm 0.4	4.9 \pm 0.2	0.002
<i>R_{ci}</i>	4.0 \pm 0.6	4.1 \pm 0.7	0.813
<i>N_{ci}</i>	3.0 \pm 0.5	3.2 \pm 0.5	0.034

Recent relevés held on average 13.8 more species than historical relevés (**Table 3.1**). However, dissimilarity between the sites slightly but significantly decreased from the historical period (**Table 3.1**), meaning that vegetation in these sites was more homogeneous in 2013-2014 than it was over the 1948-1986 period. Community indexes revealed a shift in communities' ecology toward higher values for thermophily and soil fertility and lower values for edaphic moisture. No change in community indexes for heliophily and soil pH was detected (**Table 3.1**). Between these two periods and on these sites, mean cumulative N deposition increased by 20 162 mg N m⁻² (i.e. about 200 kg N ha⁻¹), mean temperatures increased by 1.1 °C on average and annual precipitation was slightly reduced by about 100 mm on average (**Table 3.1**).

Species composition

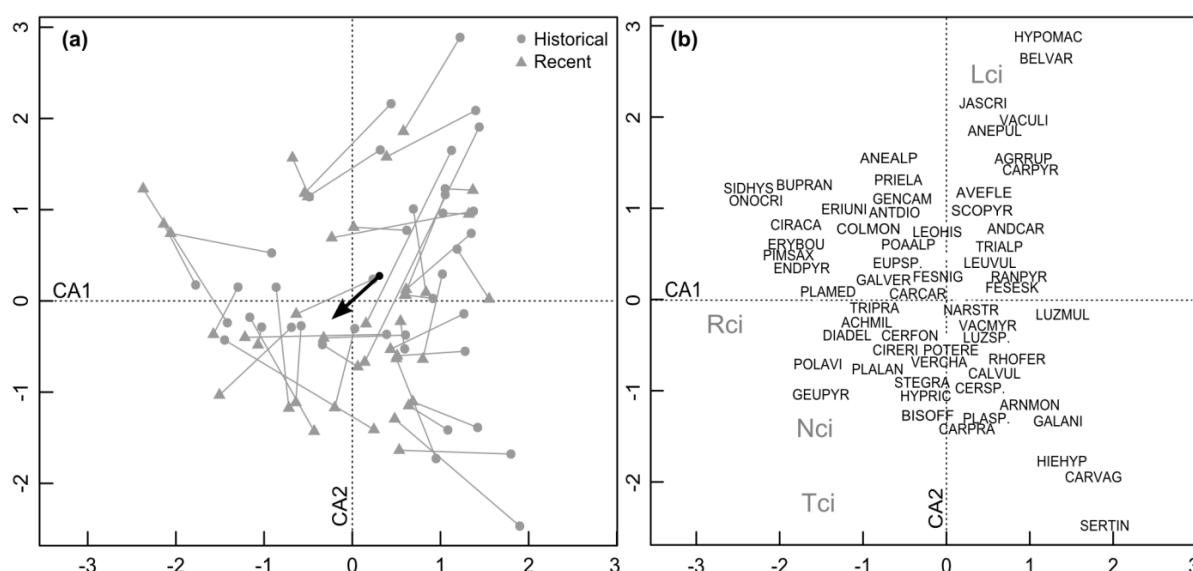


Figure 3.4. Correspondence analysis ordination plots for the first two axes. (a) displays sites. Pairs of historical (circle) and recent (triangle) relevés are linked by a grey line. The black arrow indicates the shift from the centroid of the historical group to the centroid of the recent group. (b) displays species (selected among the most abundant species and to allow the reading of all the displayed labels) and the significant *a posteriori* projected mean ecological indexes. See Appendix S2 for a list of the species acronyms. L_{ci} , T_{ci} , R_{ci} and N_{ci} = community indexes for heliophily, thermophily, soil pH and fertility respectively.

The first two axes of the CA explained respectively 9.3% and 6.6% of the total variance in species composition. There was a significant shift in species composition between the historical and recent relevés on both the first and second axes toward their negative extremities (paired Wilcoxon test, $p < 0.001$ and $p = 0.008$ respectively; **Figure 3.4a**). This shift was correlated with an increase of $CumN$ (along the first axis only), $Tmean$ and of the community indexes T_{ci} , R_{ci} , N_{ci} and with a decrease of L_{ci} (**Table 3.2**). Both axes were also positively correlated to elevation (**Table 3.2**) indicating that during the past decades some species of the sampled sites arrived from a type of vegetation more typical of lower elevation.

Although only recent relevés held information about these variables (except soil pH for which five historical relevés also mentioned it), grazing intensity and soil pH were significantly negatively correlated to the first axis whereas C:N ratio in soil was significantly positively correlated to it, and vegetation height was negatively correlated to the second axis (**Table 3.2**).

Species most associated with the recent group of relevés were *Geum pyrenaicum*, *Polygonum aviculare*, *Plantago lanceolata*, *Dianthus deltoides*, *Cirsium eriophorum*, *Cerastium fontanum* and *Achillea millefolium* whereas species most associated with the historical group were *Hypochaeris maculata*, *Bellardiochloa variegata*, *Jasione crispa*, *Vaccinium uliginosum*, *Anemone pulsatilla*, *Agrostis rupestris* and *Carex pyrenaica* (**Figure 3.4b**).

Table 3.2. Relations between the variables and the first two axes of the correspondence analysis. The coefficients and significance of the correlation with each axis (Spearman correlations tests) are indicated for all variables excepted for the community indexes. For these, the score on each axis and the significance of their projection on the 1-2 axes plan (permutation test modified according to Zelený & Schaffers, 2012) are indicated. Stars indicate levels of significance: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

	Axis1		Axis2
Geography			
<i>Elev</i>	0.45 ***		0.48 ***
<i>Lon</i>	-0.22		0.04
<i>Lat</i>	0.21		-0.44 ***
Topography			
<i>Slope</i>	-0.20		0.28 *
<i>NSasp</i>	-0.03		-0.42 ***
<i>WEasp</i>	0.38 ***		0.04
N deposition			
<i>CumN</i>	-0.47 ***		-0.14
Climate			
<i>Tmean</i>	-0.54 ***		-0.35 **
<i>Prcp</i>	0.16		-0.16
Grazing intensity	-0.46 *		0.24
Soil			
<i>N</i>	0.15		-0.16
<i>C</i>	0.22		-0.19
<i>pH</i>	-0.60 ***		0.17
<i>C:N</i>	0.35 *		-0.16
Vegetation			
<i>Cover</i>	0.02		0.00
<i>Height</i>	0.14		-0.37 *
Community indexes			
<i>L_{ci}</i>	0.20	*	0.98
<i>T_{ci}</i>	-0.58	***	-0.81
<i>F_{ci}</i>	0.92		-0.38
<i>R_{ci}</i>	-0.99	***	-0.06
<i>N_{ci}</i>	-0.78	*	-0.63

Changes in species frequencies of occurrence between the historical and recent groups revealed that far more species increased in occurrence (214, among which 123 were new for this pool of sites) than the species which decreased (80, among which 56 were not present anymore in the recent group) or remained stable (27). The species which most largely increased in occurrence have on average higher ecological values for *T*, *N* and *R* than the species which largely decreased in occurrence, although the few number of species in this last category did not allow for testing the significance of these differences (**Table 3.3**). Among the species which most largely increased in occurrence, 37% have a very large distribution area (either european, eurasiatic or cosmopolite; **Table 3.3**).

Species	Δ freq. (hist. ; rec.)	<i>L</i>	<i>T</i>	<i>F</i>	<i>R</i>	<i>N</i>	Alt. rank	Chorology
Decreasing species								
SCOPYR	-0.17 (0.25 ; 0.08)	8	3	5	3	2	4	orophyte
AGRRUP	-0.14 (0.32 ; 0.18)	8	2	4	2	1	3	orophyte
PHYHEM	-0.13 (0.18 ; 0.05)	NA	NA	NA	NA	NA	3	orophyte
Averages:		8	2.5	4.5	2.5	1.5	3.3	
Increasing species								
CARCAR	0.58 (0.2 ; 0.78)	8	5	4	3	2	NA	eurasiatic
AGRCAP	0.54 (0.38 ; 0.92)	7	5	5	4	4	6	holarctic
GALSP.	0.42 (0.4 ; 0.82)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
CAMSCH	0.35 (0.45 ; 0.8)	8	2	5	4	3	4/6	oroph. / euras.
VIOSP.	0.35 (0.15 ; 0.5)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
PILOFF	0.33 (0.15 ; 0.48)	7	5	4	4	2	5	eurasiatic
VERCHA	0.3 (0.12 ; 0.42)	6	5	5	5	5	NA	eurasiatic
THYPRA	0.28 (0 ; 0.28)	8	4	3	6	2	4	orophyte
VEROFF	0.27 (0.15 ; 0.42)	5	5	5	3	3	6	circumboreal
TRIREF	0.27 (0.25 ; 0.52)	7	5	5	5	6	6	eurasiatic
CRONUD	0.27 (0.08 ; 0.35)	8	6	5	3	3	6	basque
POLSER	0.25 (0.15 ; 0.4)	8	4	5	2	2	NA	atlantic
ALCFLA	0.25 (0.2 ; 0.45)	8	1	5	2	1	5	orophyte
VERSER	0.24 (0.08 ; 0.32)	7	5	5	5	5	NA	circumboreal
EUPSP.	0.24 (0.18 ; 0.42)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
GENCAM	0.23 (0.02 ; 0.25)	8	5	5	4	2	NA	european
CERFON	0.22 (0.18 ; 0.4)	7	5	5	5	6	4	cosmopolite
TRIPRA	0.22 (0.35 ; 0.57)	7	5	5	5	6	5	eurasiatic
POLALP	0.2 (0.08 ; 0.28)	8	2	4	7	2	5	orophyte
TARSP.	0.2 (0.1 ; 0.3)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
VACMYR	0.2 (0.22 ; 0.42)	5	4	5	2	3	6	eurasiatic
GALVER	0.2 (0.28 ; 0.48)	7	5	3	7	3	NA	holarctic
CARDEF	0.18 (0 ; 0.18)	7	2	3	8	4	5	orophyte
LOTCOR	0.18 (0.52 ; 0.7)	7	5	4	7	3	4/5	euras. / oroph.
FESNIG	0.18 (0.8 ; 0.98)	7	5	5	3	2	5	holarctic
LUZCAM	0.17 (0.05 ; 0.22)	7	5	4	3	3	NA	cosmopolite
ACHMIL	0.17 (0.18 ; 0.35)	8	5	5	5	4	6	eurasiatic
CRUGLA	0.17 (0.18 ; 0.35)	7	3	5	5	5	6	european
ANTDIO	0.16 (0.12 ; 0.28)	8	4	4	3	2	5	circumboreal
POACHA	0.16 (0.02 ; 0.18)	6	5	5	3	4	NA	european
POASUP	0.15 (0.05 ; 0.2)	8	2	5	6	6	NA	orophyte
EPIPYR	0.15 (0.35 ; 0.5)	8	3	8	2	2	NA	orophyte
AJUREP	0.15 (0 ; 0.15)	5	5	5	5	6	NA	eurasiatic
ERIUNI	0.15 (0 ; 0.15)	9	1	5	6	2	2	arctico-alpine
RANGOU	0.15 (0.1 ; 0.25)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	orophyte
PILLAC	0.15 (0.42 ; 0.57)	8	3	5	4	2	5	european
LUZPED	0.14 (0.08 ; 0.22)	7	2	5	2	2	NA	orophyte
CERSP.	0.13 (0.02 ; 0.15)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
RUMACE	0.13 (0.02 ; 0.15)	8	5	5	5	6	6	holarctic
HELSED	0.12 (0 ; 0.12)	9	2	4	9	2	4	orophyte
THEPYR	0.12 (0 ; 0.12)	8	3	4	4	2	NA	eurasiatic
RANREP	0.12 (0 ; 0.12)	5	5	7	5	7	NA	holarctic
PRUVUL	0.12 (0.1 ; 0.22)	5	5	5	6	6	NA	cosmopolite
Averages:		7.2	4.0	4.8	4.5	3.5	5.0	

Table 3.3. Change in species occurrence (Δ freq.) between historical (hist.) and recent (rec.) relevés. Only species for which the occurrence changed by more than 4 sites (i.e. Δ freq. > 0.1) are shown. For each species, its ecological values for heliophily (*L*), thermophily (*T*), soil moisture (*F*), pH (*R*) and fertility (*N*), altitudinal rank (according to Gottfried *et al.*, 2012) and chorology (according to Julve, 1998) are indicated. In bold, species absent from the historical relevés. The averages are calculated for the decreasing and increasing species groups. See Appendix S2 for a list of the species acronyms.

DISCUSSION

Changes in subalpine grasslands over the past decades

The increase in cumulative N deposition and mean temperature and the decrease in precipitation observed across the Pyrenees were consistent with global trends (IPCC, 2007; Galloway *et al.*, 2008; Gaudnik *et al.*, 2011). The significant and consistent changes in the community indexes for thermophily, soil fertility and edaphic moisture indicated that these environmental shifts have been integrated by plant communities. Species richness increased in 37 sites among the 40 re-sampled as the number of species increasing in occurrence was much higher than the one of species which occurrence decreased. Plots size (which was not included in analyses as explained in the Methods section) cannot be considered as a potential explanation of this result since the size of recent relevés (16 m²) was on average smaller than in the historical ones (63 m² \pm 40, n=28). Homogenization occurred as the species increasing in occurrence tended to be found in a great number of sites (for example *Carex caryophyllea*, *Agrostis capillaris* and *Campanula scheuchzeri* agg. raised from occurrences of 20 - 40% to occurrences of 80 - 90%) whereas the species declining were species already present in a minor number of sites (for example *Leontodon pyrenaicus*, *Agrostis rupestris* and *Phyteuma hemisphaericum* decreased from occurrences of 20 - 30% to occurrences of 5 - 20% ; **Table 3.3**). The homogenization of these communities by the increase of common and more generalist species and the decrease of some orophyte species is consistent with the results from Bühler & Roth (2011) in Switzerland and Ross *et al.* (2012) in the Highlands of Scotland, UK.

Our results agree with previous studies that have shown a positive effect of temperature increase on species diversity and composition in higher elevation belts (Gottfried *et al.*, 2012; Pauli *et al.*, 2012). However, it is the first time to our knowledge that a positive relationship between species richness and cumulative N deposition is shown in such habitats. A species composition shift towards more nutrient demanding species is commonly observed in lowland grasslands in response to increasing N deposition (Gaudnik *et al.*, 2011; Stevens *et al.*, 2011) but it results there in a decrease of species richness (Duprè *et al.*, 2010; Gaudnik *et al.*, 2011). Even in long-term experiments, chronic low-level nitrogen deposition in grasslands led to a loss of plant species richness (Clark & Tilman, 2008). On the other hand, Bühler & Roth (2011) found

that plant species richness and eutrophic or mesotrophic species increased simultaneously in Switzerland grasslands, suggesting that enhanced nutrient availability may not always have negative consequences on plant richness in such habitats.

The relationship between plant richness and precipitation peaked at around 1100 mm and precipitation was reduced by about 100 mm on average during the past decades. This suggests that, as a result of precipitation reduction, richness could have increased in sites where precipitation ranged historically between 1200 and 1500 mm and diminished in sites where precipitation was inferior to 1100 mm in the past. On the other hand, the highest richness was reached for a mean F_{ci} (an indicator of soil moisture) of around 5, a value that already characterized historical vegetation. Accordingly, any decrease of mean F_{ci} would have resulted in an overall reduction of plant richness rather than an increase. Such difficulties in interpreting relations between precipitation, soil moisture and vegetation in these communities might reflect the complex links between these components, especially through influences of local topography (slope and aspect) and precipitation form (snow or rain). However, although precipitation explained part of the composition in the database approach, it did not correlate with the temporal trajectories of the re-sampled communities suggesting no major role of this climate change component in the global shift of community composition.

For centuries, the studied grasslands have been semi-natural habitats shaped and maintained by extensive grazing management. Therefore, changes in grazing management could have, over decades, deeply driven the dynamic of the studied communities. Unfortunately, local historical data on grazing is lacking on the studied sites, preventing us from accounting for management changes in our analyses. Despite this, we suggest that grazing changes could not have been responsible for the global pattern observed here. Indeed, extensive grazing usually promotes species richness (de Bello et al., 2006; Sebastià et al., 2008a) and a decline of flocks can lead to a decrease of floristic diversity (Galop et al. 2011). Since 1970, livestock units have declined across the Pyrenees by about 18% on average (Bozzolo 2012) which could have led to an overall decrease of plant richness rather than an increase. Moreover, grazing decline was far from being homogeneous over the region. Indeed, grazing decline has been strongly marked in the Eastern Pyrenees, less in the Central Pyrenees and fairly imperceptible in the Western Pyrenees (Galop et al, 2011) where grazing intensity is currently the highest (Bozzolo 2012; ACAP-Pyrénées, 2010). Moreover, during the re-sampling we actually observed intensively grazed sites whereas others appeared only faintly grazed, even in the same areas, suggesting highly different grazing management trajectories at local scale. All things considered, such

spatially and temporally heterogeneous grazing changes could hardly be responsible for the very consistent richness increase observed across sites. Nonetheless, by limiting competition for light, creating free space or as a vector of seed dispersion, grazing could have facilitated the establishment and/or the extension of the species favored by increasing temperature and nitrogen availability, and limited the competitive exclusion of local species. This hypothesis is consistent with recent grazing intensity being orientated in the same direction as temperature and cumulative N deposition in the re-sampling approach.

Which mechanisms can explain these changes?

Our results revealed clearly that, contrary to what has been observed in all previous studies, essentially in lowland habitats, N deposition has not generated until now visible negative effects on vascular plant richness in subalpine grasslands. Soil acidification enhancing the availability of toxic ions (Maskell *et al.*, 2010) and eutrophication leading to competitive exclusion (Hautier *et al.*, 2009) are the two main causes evoked to explain detrimental impacts of N deposition on species richness. Although our study confirms that soil pH is a first determinant of species richness and composition in our studied communities, no decrease in R_{ci} was observed over the past decades. Moreover, the species associated with higher temperature and cumulative N deposition were also associated with higher pH and R_{ci} values in the multivariate analyses. These results suggest that cumulative N deposition has not led to significant soil acidification in these habitats. Subalpine grasslands have commonly lower vegetation height (10.5 cm on average on our sites) compared to low elevation grasslands. Although the species associated with the recent relevés tended to have lower L_{ci} values, no significant change of L_{ci} was observed in these communities during the past decades. These results suggest that competition for light was not strong enough to prevent the establishment of new species and to cause a significant net loss of species by excluding the less competitive ones.

The productivity and the richness of high elevation vegetation are typically constrained by low temperature and nutrient availability (Körner, 1999). The increase of mean temperature and the addition of exogenous N compounds (mainly NO_3^- and NH_4^+), readily available for plants, can alleviate the abiotic constraints, thus reducing the strength of the abiotic filter on these plant communities. This can allow less stress-tolerant species (*sensu* Grime, 1977), physiologically adapted to warmer temperature and richer soils, to establish. This hypothesis is supported by the relation observed between species richness and N_{ci} (used here as a surrogate for soil fertility): for mean N_{ci} under 3.5 (on a 1 to 9 scale), which was the case of more than 90% of our plots, species richness increased with N_{ci} . Moreover, the C:N ratio in soil decreased and the

vegetation height increased in the direction of the shift from historical to recent relevés, suggesting less constraining conditions. Both compositional analyses highlighted a shift from typically high-elevation species, *i.e.* particularly well adapted to low temperature and/or nutrient availability (*Ranunculus pyrenaicus*, *Alopecurus gerardi*, *Trifolium alpinum*, *Plantago alpina*, *Scorzoneroïdes pyrenaica*, *Bellardiochloa variegata*, *Jasione crispa*, *Agrostis rupestris* and *Carex pyrenaica*) to species having lower altitudinal range optima (*Agrostis capillaris*, *Galium verum*, *Lotus corniculatus*, *Pilosella lactucella*, *Carex caryophylla*, *Polygonum aviculare*, *Plantago lanceolata*, *Cerastium fontanum* and *Achillea millefolium*) along increasing temperature and cumulative N deposition gradients. *Trifolium alpinum* and *Plantago alpina* have already been found as particularly negatively impacted by N inputs in similar communities (Bassin *et al.*, 2013) whereas *Cerastium fontanum* was associated with high levels of N deposition in lowland acidic grasslands (Stevens *et al.*, 2011). Altogether these data and the trajectory of community composition along the elevation gradient in the re-sampling analysis provide evidence that the upward migration of species (Lenoir *et al.*, 2008; Parolo & Rossi, 2008; Gottfried *et al.*, 2012) is chiefly responsible for the observed richness and compositional shifts. However, filling processes of species already present at a site but in a neighbor community (Cannone & Pignatti, 2014) might have also played a role in these changes as some typically orophyte species have also increased in frequency.

Conclusions and perspectives

This is, to our knowledge, the first study showing evidences of a positive relation between cumulative N deposition and plant species richness, and of an additive effect of both climate warming and N deposition on the past decades changes in subalpine grasslands. These two major components of global change induced an increase in local vascular species richness by releasing the abiotic constraints of these habitats. Although species richness increased, meaning that locally more new generalist species established than specialized species disappeared, the ecology of these communities changed toward less temperature and nutrient limited and their uniqueness decreased. Our data suggest that soil fertility has increased but not enough to induce a loss of diversity. This would likely occur if N deposition continues to increase. Indeed, species richness started to decrease at *Nci* above 3.3, possibly as a consequence of competitive exclusion as modeled by Grime (1977). Therefore, an increase of *Nci* similar as the one of the last 60 years would likely provoke a significant loss of diversity in these habitats.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank E. Reuzeau, C. Bergès, L. Risser, S. Déjean, V. Rivalland, S. Vicente, A. Colette, F. Couvidat, J. Archambeau, M. De Ronne, A. Landré and M. Picart for their help. We are grateful to the CBNPMP, SOPHY and SIVIM databases, and to the authors of the historical vegetation relevés whose past work made this study possible. Many thanks to G. Largier, L. Galsomiès and all the participants of the ANEMONE project for discussions about this study. This work was funded by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME; ANEMONE project N° 1262C0013), the Communauté de Travail des Pyrénées through the regions Midi-Pyrénées (ANEMONE project N°11051284), Aquitaine (ANEMONE project N°1262C0013) and Aragón (ANEMONE project N°CTPP13/11) and the Observatoire Homme Milieux Pyrénées (OHM) du Haut Vicdessos. This work was supported by the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

REFERENCES

- ACP-Pyrénées (2010) Les chiffres clés de l'Agriculture. <http://agriculturepyrenees.fr/l-agriculture-pyreneenne/chiffres-cles>.
- Bassin, S., Schalajda, J., Vogel, A. & Suter, M. (2012) Different types of sub-alpine grassland respond similarly to elevated nitrogen deposition in terms of productivity and sedge abundance. *Journal of Vegetation Science*, **23**, 1024–1034.
- Bassin, S., Volk, M. & Fuhrer, J. (2013) Species composition of subalpine grassland is sensitive to nitrogen deposition, but not to ozone, after seven years of treatment. *Ecosystems*, **16**, 1105–1117.
- Bassin, S., Volk, M., Suter, M., Buchmann, N. & Fuhrer, J. (2007) Nitrogen deposition but not ozone affects productivity and community composition of subalpine grassland after 3 yr of treatment. *New Phytologist*, **175**, 523–34.
- De Bello, F., Lepš, J. & Sebastià, M. (2006) Variations in species and functional plant diversity along climatic and grazing gradients. *Ecography*, **6**, 801–810.
- Bobbink, R., Hicks, K., Galloway, J., Spranger, T., Alkemade, R., Ashmore, M., Bustamante, M., Cinderby, S., Davidson, E., Dentener, F., Emmett, B., Erisman, J.-W., Fenn, M., Gilliam, F., Nordin, A., Pardo, L. & De Vries, W. (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological applications*, **20**, 30–59.
- Bowman, W., Theodose, T., Schardt, J. & Conant, R. (1993) Constraints of nutrient availability on primary production in two alpine tundra communities. *Ecology*, **74**, 2085–2097.
- Bozzolo G. (2012) Coup d'œil sur l'évolution de l'agriculture montagnarde en Pyrénées. La buvette des Alpages: <http://www.buvettedesalpages.be/2012/11/agriculture-pyreneenne-etat-des-lieux-et-solutions.html>
- Braun-Blanquet, J. (1932) *Plant sociology. The study of plant communities*, McGraw Hil. New York.
- Bühler, C. & Roth, T. (2011) Spread of common species results in local-scale floristic homogenization in grassland of Switzerland. *Diversity and Distributions*, **17**, 1089–1098.

- Cannone, N. & Pignatti, S. (2014) Ecological responses of plant species and communities to climate warming: upward shift or range filling processes? *Climatic Change*, **123**, 201–214.
- Chytrý, M. (2001) Phytosociological data give biased estimates of species richness. *Journal of Vegetation Science*, **12**, 439–444.
- Chytrý, M., Tichý, L., Hennekens, S.M. & Schaminée, J.H.J. (2014) Assessing vegetation change using vegetation-plot databases: a risky business. *Applied Vegetation Science*, **17**, 32–41.
- Clark, C.M. & Tilman, D. (2008) Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, **451**, 712–5.
- Duprè, C., Stevens, C.J., Ranke, T., Bleeker, A., Peppler-Lisbach, C., Gowing, D.J.G., Dise, N.B., Dorland, E., Bobbink, R. & Diekmann, M. (2010) Changes in species richness and composition in European acidic grasslands over the past 70 years: the contribution of cumulative atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology*, **16**, 344–357.
- Ellenberg, H., Weber, H., Düll, R., Wirth, V., Werner, W. & Paulissen, D. (1992) Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. 2nd ed. *Scripta Geobotanica*, **18**, 1–248.
- Erisman, J.W., Bleeker, A., Galloway, J. & Sutton, M.S. (2007) Reduced nitrogen in ecology and the environment. *Environmental pollution*, **150**, 140–9.
- Füssel, H., Jol, A., Kurnik, B. & Hemming, D. (2012) *Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2012: an indicator-based report.*, Copenhagen.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L. a, Seitzinger, S.P. & Sutton, M. a (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, **320**, 889–92.
- Galop, D., Houet, T., Mazier, F., Leroux, G., & Rius D. (2011) Grazing activities and biodiversity history in the Pyrenees: new insights on high altitude ecosystems in the framework of a human-Environment observatory. *PAGES news* 19, 53–55.
- Gaudnik, C., Corcket, E., Clément, B., Delmas, C.E.L., Gombert-Courvoisier, S., Muller, S., Stevens, C.J. & Alard, D. (2011) Detecting the footprint of changing atmospheric nitrogen deposition loads on acid grasslands in the context of climate change. *Global Change Biology*, **17**, 3351–3365.
- Gottfried, M., Pauli, H., Futschik, A., Akhalkatsi, M., Barančok, P., Benito Alonso, J.L., Coldea, G., Dick, J., Erschbamer, B., Fernández Calzado, M.R., Kazakis, G., Krajčič, J., Larsson, P., Mallaun, M., Michelsen, O., Moiseev, D., Moiseev, P., Molau, U., Merzouki, A., Nagy, L., Nakhutsrishvili, G., Pedersen, B., Pelino, G., Puscas, M., Rossi, G., Stanisci, A., Theurillat, J.-P., Tomaselli, M., Villar, L., Vittoz, P., Vogiatzakis, I. & Grabherr, G. (2012) Continent-wide response of mountain vegetation to climate change. *Nature Climate Change*, **2**, 111–115.
- Grime, J.P. (1977) Evidence for the Existence of Three Primary Strategies in Plants and Its Relevance to Ecological and Evolutionary Theory. *The American Naturalist*, **111**, 1169.
- Hautier, Y., Niklaus, P.A. & Hector, A. (2009) Competition for light causes plant biodiversity loss after eutrophication. *Science*, **324**, 636–8.
- Herrera, S., Gutiérrez, J.M., Ancell, R., Pons, M.R., Frías, M.D. & Fernández, J. (2012) Development and analysis of a 50-year high-resolution daily gridded precipitation dataset over Spain (Spain02). *International Journal of Climatology*, **32**, 74–85.
- Hiltbrunner, E., Schwikowski, M. & Körner, C. (2005) Inorganic nitrogen storage in alpine snow pack in the Central Alps (Switzerland). *Atmospheric Environment*, **39**, 2249–2259.
- Hutchison, J.S. & Henry, H.A.L. (2010) Additive Effects of Warming and Increased Nitrogen Deposition in a Temperate Old Field: Plant Productivity and the Importance of Winter. *Ecosystems*, **13**, 661–672.

- IPCC (2007) *Climate Change 2007: The physical science basis*, (ed. by S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, and H.L. Miller) Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.
- Julve, P. (1998) Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version 2013.
- Körner, C. (1999) *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*, 1st edn. Springer.
- Lenoir, J., Gégout, J.C., Marquet, P.A., de Ruffray, P. & Brisse, H. (2008) A significant upward shift in plant species optimum elevation during the 20th century. *Science*, **320**, 1768–71.
- Maskell, L.C., Smart, S.M., Bullock, J.M., Thompson, K. & Stevens, C.J. (2010) Nitrogen deposition causes widespread loss of species richness in British habitats. *Global Change Biology*, **16**, 671–679.
- Menut, L., Bessagnet, B., Khvorostyanov, D., Beekmann, M., Blond, N., Colette, A., Coll, I., Curci, G., Foret, G., Hodzic, A., Mailler, S., Meleux, F., Monge, J.-L., Pison, I., Siour, G., Turquety, S., Valari, M., Vautard, R. & Vivanco, M.G. (2013) CHIMERE 2013: a model for regional atmospheric composition modelling. *Geoscientific Model Development*, **6**, 981–1028.
- Onipchenko, V.G., Makarov, M.I., Akhmetzhanova, A.A., Soudzilovskaia, N.A., Aibazova, F.U., Elkanova, M.K., Stogova, A. V. & Cornelissen, J.H.C. (2012) Alpine plant functional group responses to fertiliser addition depend on abiotic regime and community composition. *Plant and Soil*, **357**, 103–115.
- Parolo, G. & Rossi, G. (2008) Upward migration of vascular plants following a climate warming trend in the Alps. *Basic and Applied Ecology*, **9**, 100–107.
- Pasche, F., Armand, M., Gouaux, P., Lamaze, T. & Pornon, A. (2004) Are meadows with high ecological and patrimonial value endangered by heathland invasion in the French central Pyrenees? *Biological Conservation*, **118**, 101–108.
- Pauli, H., Gottfried, M., Dullinger, S., Abdaladze, O., Akhalkatsi, M., Benito Alonso, J.L., Coldea, G., Dick, J., Erschbamer, B., Fernández Calzado, R., Ghosn, D., Holten, J.I., Kanka, R., Kazakis, G., Kollár, J., Larsson, P., Moiseev, P., Moiseev, D., Molau, U., Molero Mesa, J., Nagy, L., Pelino, G., Puşcaş, M., Rossi, G., Stanisci, A., Syverhuset, A.O., Theurillat, J.-P., Tomaselli, M., Unterluggauer, P., Villar, L., Vittoz, P. & Grabherr, G. (2012) Recent plant diversity changes on Europe's mountain summits. *Science*, **336**, 353–5.
- Phoenix, G.K., Emmett, B.A., Britton, A.J., Caporn, S.J.M., Dise, N.B., Helliwell, R., Jones, L., Leake, J.R., Leith, I.D., Sheppard, L.J., Sowerby, A., Pilkington, M.G., Rowe, E.C., Ashmore, M.R. & Power, S.A. (2012) Impacts of atmospheric nitrogen deposition: responses of multiple plant and soil parameters across contrasting ecosystems in long-term field experiments. *Global Change Biology*, **18**, 1197–1215.
- Price, M. & Waser, N. (2000) Responses of subalpine meadow vegetation to four years of experimental warming. *Ecological Applications*, **10**, 811–823.
- Quintana-Seguí, P., Le Moigne, P., Durand, Y., Martin, E., Habets, F., Baillon, M., Canellas, C., Franchisteguy, L. & Morel, S. (2008) Analysis of Near-Surface Atmospheric Variables: Validation of the SAFRAN Analysis over France. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*, **47**, 92–107.
- Remke, E., Brouwer, E., Kooijman, A., Blindow, I., Esselink, H. & Roelofs, J.G.M. (2009) Even low to medium nitrogen deposition impacts vegetation of dry, coastal dunes around the Baltic Sea. *Environmental pollution*, **157**, 792–800.
- Rich, T., Redbane, M., Fasham, M., McMeechan, F. & Dobson, D. (2005) *Ground and shrub vegetation. Handbook of Biodiversity Methods: Survey, Evaluation and Monitoring* (ed. by D. Hill, M. Fasham, G. Tucker, M. Shewry, and P. Shaw), pp. 201–222. Cambridge University Press, Cambridge.

- Ross, L.C., Woodin, S.J., Hester, A.J., Thompson, D.B.A. & Birks, H.J.B. (2012) Biotic homogenization of upland vegetation: Patterns and drivers at multiple spatial scales over five decades. *Journal of Vegetation Science*, **23**, 755–770.
- Sebastià, M.-T., de Bello, F., Puig, L. & Taull, M. (2008a) Grazing as a factor structuring grasslands in the Pyrenees. *Applied Vegetation Science*, **11**, 215–222.
- Sebastià, M.-T., Kirwan, L., Connolly, J., Group, E.M. & Castle, J. (2008b) Strong shifts in plant diversity and vegetation composition in grassland shortly after climatic change. *Journal of Vegetation Science*, **19**, 299–306.
- Spasojevic, M., Bowman, W., Humphries, H.C., Seastedt, T. & Suding, K.N. (2013) Changes in alpine vegetation over 21 years: Are patterns across a heterogeneous landscape consistent with predictions? *Ecosphere*, **4**, 117.
- Stevens, C., Duprè, C., Gaudnik, C., Dorland, E., Dise, N., Gowing, D., Bleeker, A., Alard, D., Bobbink, R., Fowler, D., Vandvik, V., Corcket, E., Mountford, J.O., Aarrestad, P.A., Muller, S. & Diekmann, M. (2011) Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition. *Journal of Vegetation Science*, **22**, 207–215.
- Stevens, C.J., Dise, N.B., Mountford, J.O. & Gowing, D.J. (2004) Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. *Science*, **303**, 1876–9.
- Stevens, C.J., Duprè, C., Dorland, E., Gaudnik, C., Gowing, D.J.G., Bleeker, A., Diekmann, M., Alard, D., Bobbink, R., Fowler, D., Corcket, E., Mountford, J.O., Vandvik, V., Aarrestad, P.A., Muller, S. & Dise, N.B. (2010) Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. *Environmental pollution*, **158**, 2940–5.
- Vittoz, P., Randin, C., Dutoit, A., Bonnet, F. & Hegg, O. (2009) Low impact of climate change on subalpine grasslands in the Swiss Northern Alps. *Global Change Biology*, **15**, 209–220.
- Windmaïßer, T. & Reisch, C. (2013) Long-term study of an alpine grassland: local constancy in times of global change. *Alpine Botany*, **123**, 1–6.
- Zavaleta, E.S., Shaw, M.R., Chiariello, N.R., Mooney, H.A. & Field, C.B. (2003) Additive effects of simulated climate changes, elevated CO₂, and nitrogen deposition on grassland diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 7650–4.
- Zelený, D. & Schaffers, A.P. (2012) Too good to be true: pitfalls of using mean Ellenberg indicator values in vegetation analyses. *Journal of Vegetation Science*, **23**, 419–431.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1. References of the vegetation-plot data collected for this study.

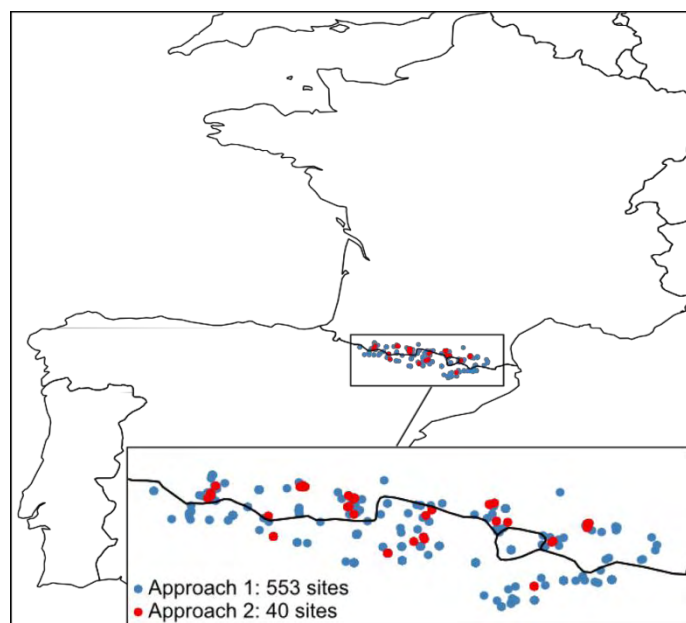
Author(s)	Year	Reference	Number of plots
Aldezabal A.	1997	Análisis de la interacción de la vegetación-grandes herbívoros en las comunidades supraforestales del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido (Pirineo Central, Aragón). Tesis doctoral, Universidad del País Vasco, España).	35
Alonso, J.L.B.	2006	Vegetación del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido (Sobrarbe, Pirineo Central aragonés). Zaragoza: Publicaciones del Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón.	9
Arbella M.	1988	Formaciones pascícolas supraforestales en la reserva de la biosfera de Ordesa. Memoria Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.	34
Ascaso J.	1992	Estudio fitocenológico y valoración de los pastos de puerto del Valle de Benasque (Pirineo oscense). Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.	37
Braun-Blanquet J.	1948	La végétation alpine des Pyrénées orientales. Etude de phytosociologie comparée. Monog. Est. Piren. y del Inst. Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal, Barcelona, 9, 1-306.	28
Briot J.	1984	Recherche d'une méthode d'évaluation phytoécologique en milieu accidenté: application au vallon de Magnabaigt, vallées d'Ossau (Pyrénées Atlantiques). Thèse de troisième cycle, université Paul-Sabatier, Toulouse, 127 p. + Annexes, 18 p.	26
Carrillo E. & Ninot J.M.	1990	Noves communitats pratenses dels Pirineus centrals. Fol. Bot. Misc., 7, 99-114.	19
Carrillo E. & Ninot J.M.	1992	La Flora i la vegetacion de les valls d'Espot i de Boi (II). I.E.C., Arx. Secc. Ciènc., 99 (2) 351 pp. Barcelona.	31
Carrillo E., Carreras J., Font X., Ninot J.M., Soriano I. & Vigo J.	2000	La vegetació de les serres prepirinenques compreses entre els rius Segre i Llobregat. 4-Pastures alpines i subalpines. Bull. Soc. Linn. Provence, 51, 95-120.	18
Carreras J.	1993	Flora y vegetació de Sant Joan de l'Erm i de la vall de Santa Magdalena (Pirineus Catalans). Col. Estudis, 3:321 pp. Inst.Est.Ilerd, Lleida.	25
Carreras J., Carrillo E., Masalles R.M., Ninot J.M. & Vigo J.	1993	El poblament vegetal de les valls de Barravés i de Castanesa. Acta Bot. Barcin. 42. 392p.	45
CBNPMP	2002-2010	Surveys by the Conservatoire Botanique National Pyrénées et Midi-Pyrénées, personal communication.	25
Dantin G.	1985	Contribution à l'étude des relations entre végétation et formations superficielles dans les espaces supraforestiers : le vallon supérieur du gave de Bious (Haut-Ossau, Pyrénées Atlantiques).	16
De Foucault B.	1988	Notes phytosociologiques sur la végétation observée lors de la quatorzième session de la Société Botanique du Centre-Ouest en Cerdagne et Capcir. Bull. Soc. Bot. Centre-Ouest, 19, 387-400.	3
Ducasse F. & Bourraqui-Sarre L.	1996	Etude floristique de milieux d'altitude en vallée du Marcadau et dans le vallon d'Estibère (Hautes-Pyrenees). Mémoire de D.E.S. et D.U.R. de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, 1-70.	18
Dupouey J.L.	1981	Contribution à l'étude phytosociologique du massif des Eaux-chaudes (Pyrénées-Atlantiques). DEA Écologie Végétale. Univ. Orsay. Paris.	5
Fromard F.	1978	Recherches sur la dynamique de la végétation des milieux supraforestiers pyrénéens: la vallée du Soulcem, Haute-Ariège. Thèse de troisième cycle, université Paul-Sabatier, Toulouse, 156 p.	26
Gruber M.	1975	Les associations du Nardion en Pyrénées ariégeoises et catalanes. Bull. Soc. Bot. Fr., 122, 401-416.	42

Gruber M.	1978	La végétation des Pyrénées ariégeoises et catalanes occidentales. Thèse, Fac. Sc. T. St. Jerome. Université Aix-Marseille III, Marseille.	6
Klein J.C.	1979	Application de l'analyse factorielle des correspondances à l'étude phytosociologique de l'étage alpin des Pyrénées centrales. <i>Phytocoenologia</i> , 5 (2), 125-188.	7
Labroue L. & Lascombes G.	1972	L'évolution de la végétation et des sols au Pic du Midi de Bigorre (Hautes Pyrénées) l'étage subalpin supérieur. <i>Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse</i> , Tom. 108, Fasc. 1-2, 9-37.	1
Lazare J.J., Cantenot Y., Riba Mazas S., Darquistade A., Pujos J.	2005	Additions à la flore d'Andorre. <i>J. Bot. Soc. Bot. France</i> , Tom. 29, 77-85.	9
Mustin L.	1983	Contribution à l'étude de la végétation des milieux supraforestiers pyrénéens: le vallon du Laurenti (Ariège). Thèse de troisième cycle, Université Paul-Sabatier, Toulouse, 271 p.	7
Nègre R.	1969	La végétation du bassin de l'One (Pyrénées Centrales). Deuxième note: les pelouses. <i>Port. Acta. Biol.</i> X, 1-137.	52
Nègre R.	1974	Nouvelle contribution à l'étude des gispetières pyrénéennes. <i>Bol. Soc. Broteriana</i> , 48 (2 ^a série), 209-251.	80
Nègre R. & Serve L.	1979	Prospection dans les groupements à <i>Festuca eskia</i> en Pyrénées Orientales. <i>Doc. Phytos.</i> , N.S. Vol. IV, Lille.	47
Ninot J.M.	1996	Estudio fitocenológico del macizo del Turbón (Prepirineo central). <i>Lucas Mallada</i> 8, 121-182.	7
Ninot Sugranès J.M.	1988	Sobre la vegetació pratense supraforestal del Massís del Turbó (Prepirineu Aragonés). <i>Monogr. Inst. Pir. Ecología. Homenaje a Pedro Montserrat</i> , 4: 677-685.	7
Ortega J.D.	2006	Flora y vegetació del territori comprès entre el riu Segre i el Port del Comte (Prepirineus catalans, Lleida). Tesis doctoral, Universitat de Barcelona.	5
Peeters A. & Vanden Berghen C.	1981	Les nardaies subalpines de la Principauté d'Andorre (Pyrénées Orientales). <i>Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.</i> , 114, 61-75.	36
Pons D.	1984	Contribution à l'étude de la végétation des milieux supraforestiers pyrénéens: le massif du Madres (Pyrénées-Orientales). Thèse de troisième cycle, Université Paul-Sabatier, Toulouse.	7
Rivas-Martínez S., Bascónes J.C., Díaz T.E., Fernández-González F., Loidi J.	1991	Vegetación del Pirineo-Occidental y Navarra. <i>Itinera Geobot.</i> , 5, 5-456.	42
Soriano J.	1992	Estudi florístic i geobotànic de la Serra de Moixeró i el massís de la Tosa d'Alp (Pirineus orientals).	11
Soula-Espiasse C.	1985	Contribution à l'étude de la végétation du massif calcaire centro-ariégeois (Mont Ceint et Mont Béas). Thèse de troisième cycle, Université Paul-Sabatier, Toulouse, 207 p.	6
Tosca C.	1986	Structure, Dynamique et Fonctionnement des écosystèmes prairiaux supra-forestiers des Pyrénées centrales. Thèse de troisième cycle, Université Paul-Sabatier, Toulouse, 270 p.	11
Turmel J.M.	1955	Le pic de Midi d'Ossau. <i>Ecologie et Végétation. Mém. Mus. Nat. Hist. Nat.</i> , série B, 5, 1-208.	19
Vigo J.	1972	Notes sur les pelouses subalpines des Prépyrénées orientales. <i>Pirineos</i> , 105, 47-59.	6
Vigo J.	1996	El poblament vegetal de la Vall de Ribes. <i>Institut Cartogràfic de Catalunya</i> , 468 pp., Barcelona.	26
Vives J.	1964	Vegetación de la alta cuenca del Cardener (estudio florístico y fitocenológico comarcal). <i>Acta Geobot. Barc.</i> , 1: 1-218.	5
Total			839

Table S2. Detailed information about the 40 sites re-visited: year/date, author and plot size of the historical and recent relevés and sites location information. Lon. (DD) = Longitude (Decimal degrees WGS84), Lat. (DD) = Latitude (Decimal degrees WGS84). Recent authors: Bdx = E. Corcket, D. Alard, C. Blaix (and G. Corriol); Jaca = L. Villar, J.-J. Jimenez; Tlse = M. Boutin, A. Pornon, C. Lemaire; All = all recent authors.

N°	Historical			Recent			Location					
	Year	Authors	Size (m ²)	Date	Authors	Size (m ²)	Slope (°)	Elevation (m)	ExNS	ExWE	Lon. (DD)	Lat. (DD)
1	1975	Gruber M.	NA	29/08/2013	Tlse	16	6	1750	-2	-2	1.003833	42.758111
2	1975	Gruber M.	NA	29/08/2013	Tlse	16	3	1850	0	-4	0.964972	42.722889
3	1983	Mustin L.	50	25/07/2013	Tlse	16	30	1940	0	4	2.021667	42.672861
4	1983	Mustin L.	50	25/07/2013	Tlse	16	40	2260	4	0	2.008472	42.668639
5	1948	Braun-Blanquet J.	100	24/07/2013	Tlse	16	0	1950	0	0	2.013528	42.649694
6	1948	Braun-Blanquet J.	100	24/07/2013	Tlse	16	2	2100	0	4	2.007972	42.642972
7	1948	Braun-Blanquet J.	100	23/07/2013	Tlse	16	2	2250	-2	2	1.779750	42.549750
8	1948	Braun-Blanquet J.	100	23/07/2013	Tlse	16	2	2050	-4	0	1.788556	42.556611
9	1969	Nègre R.	100	17/07/2013	Tlse	16	0	1912	4	0	0.504222	42.836361
10	1969	Nègre R.	100	18/07/2013	Tlse	16	3	2110	-4	0	0.457944	42.778222
11	1969	Nègre R.	100	16/07/2013	Tlse	16	6	1950	0	4	0.464667	42.851167
12	1969	Nègre R.	100	19/07/2013	Tlse	16	0	1950	4	0	0.499528	42.730417
13	1969	Nègre R.	100	17/07/2013	Tlse	16	11	1800	0	4	0.498861	42.828333
14	1969	Nègre R.	100	18/07/2013	Tlse	16	2	2013	0	4	0.468111	42.779611
15	1975	Tosca C.	32	10/07/2013	All	16	22	1780	0	-4	0.183417	42.908389
16	1984	Briot J.	NA	13/09/2013	Jaca	16	20	1680	2	-2	-0.427750	42.868306
17	1984	Briot J.	NA	14/08/2013	Jaca	16	10	2000	-2	2	-0.428806	42.850972
18	1984	Briot J.	NA	08/08/2013	Jaca	16	10	2050	-4	0	-0.426750	42.849056
19	1975	Gruber M.	NA	18/09/2013	Jaca	16	3	2100	-2	2	0.956167	42.569861
20	1975	Gruber M.	NA	19/09/2013	Jaca	16	6	1850	2	-2	0.886611	42.553833
21	1975	Tosca C.	32	22/07/2013	Bdx	16	7	2090	1	3	0.168694	42.916639
22	1981	Dupouey J.L.	10	23/07/2013	Bdx	16	0	1630	0	0	-0.395722	42.913278
23	1975	Gruber M.	NA	24/07/2013	Bdx	16	3	1950	-2	2	1.494889	42.679056
24	1975	Gruber M.	NA	25/07/2013	Bdx	16	6	1960	-4	0	1.421889	42.684806
25	1975	Gruber M.	NA	25/07/2013	Bdx	16	3	1950	-2	-2	1.422194	42.686250
26	1985	Soula-Espiasse C.	100	26/07/2013	Bdx	16	20	1630	-4	0	1.380444	42.793222
27	1985	Soula-Espiasse C.	100	16/07/2014	Tlse	16	5	1600	-4	0	1.408972	42.802889
28	1985	Soula-Espiasse C.	50	17/07/2014	Tlse	16	20	1570	0	-4	1.378611	42.795250
29	1985	Soula-Espiasse C.	100	16/07/2014	Tlse	16	10	1570	4	0	1.374833	42.794000
30	1975	Gruber M.	NA	17/07/2014	Tlse	16	6	2450	-2	-2	0.950000	42.583333
31	1977	Carillo E. et al.	6	22/07/2014	Tlse	16	15	2010	-4	0	1.666255	42.264453
32	1979	Carillo E. et al.	6	23/07/2014	Tlse	16	15	1900	-4	0	1.666255	42.264453
33	1978	Carillo E. et al.	10	23/07/2014	Tlse	16	10	1900	-3	1	1.666255	42.264453
34	1985	Aldezabal A.	25	15/08/2014	Jaca	16	3	1980	-4	0	-0.021944	42.586944
35	1985	Dantin G.	NA	15/08/2014	Jaca	16	13	2170	-4	0	-0.446639	42.834139
36	1975	Tosca C.	32	18/08/2014	Bdx	16	7	2000	4	0	0.150083	42.908028
37	1975	Tosca C.	32	19/08/2014	Bdx	16	28	1800	-4	0	0.167306	42.906556
38	1948	Braun-Blanquet J.	100	19/08/2014	Bdx	16	0	2100	0	0	-0.055083	42.719472
39	1986	Carreras J. et al.	12	21/08/2014	Bdx	16	30	1920	-3	-1	0.718333	42.478333
40	1986	Carreras J. et al.	10	22/08/2014	Bdx	16	25	2130	-3	1	0.718333	42.478333

Figure S1. Location of the sites over the Pyrenean massif. In blue, the 553 sites used for the first approach; in red, the 40 sites re-sampled for the second approach. Several sites may be superposed on the map.



Appendix S1. Supplementary methods.

Cumulated N deposition calculation

Emissions trends were applied to 2010 CHIMERE deposition estimates for each 7×7 km grid cell of our geographical range in order to calculate an estimated N deposition value for each year since 1940. Because reduced (NH_y) and oxidized (NO_x) N forms had different emission trends over the past decades, they were treated separately. On the contrary, dry and wet depositions were not discriminated. The N deposition estimated by CHIMERE for the year 2010 over the studied area ranged from 150 to 305 mg N m⁻² yr⁻¹ for NO_x deposition and from 145 to 670 mg N m⁻² yr⁻¹ for NH_y deposition. For reduced N forms, the trend considered here was a 2.5 times steady increase of emissions (and consequently deposition) between 1940 and 1980 which then stabilized until 2014. For oxidized N, we considered a steady increase from 1946 to 1980 (multiplied by 96 between these two dates), stabilization between 1980 and 1991, and then a steady decrease until 2014 (divided by 2.1 between these two dates). We calculated for each plot the variable CumN as the sum of NO_x and NH_y depositions from 1940 to the sampling year.

Climatic data

The annual mean temperature was obtained as the average of the annual mean of monthly minimum and maximum temperatures as only these two variables were available from both the SAFRAN and SPAIN02 models (whereas annual mean temperature was available only from

SAFRAN). We verified that our estimated values were very strongly correlated with the annual mean temperature values furnished by the SAFRAN model (Spearman correlation test, $p < 0.001$, $\rho = 0.98$, $n = 231$). Moreover, calculating an average on the 8 years before the sampling year implied for the oldest plots to extrapolate models data back to the year 1941. To achieve this extrapolation for the years lacking, we applied the northern hemisphere anomalies of temperature and the northern Europe anomalies of precipitation furnished by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2007) on the 1961-1990 mean temperature and precipitation from the models for each grid cell of the geographical range of the study. The same principle but was applied to extrapolate SPAIN02 data from 2007 to 2013 but on the basis of the SAFRAN data rather than the IPCC data. Finally, as SAFRAN data stopped in 2013, *Tmean* and *Prdp* for all the re-sampled plots were calculated over the years 2006 to 2013 (even for the plots actually sampled in 2014).

Both N deposition and climatic data were spatially interpolated at the coordinates of our sites by the nearest neighbor method.

Phytosociologic and taxonomic information

The first 839 relevés selected in the Nardion strictae Br.-Bl. 1926 sensu lato community type were mainly from the Festucetalia spadiceae Barbero 1970 (see de Foucault, 2012). Both these communities and the related Violion caninae Schwick. 1944 alliance belong to the Nardetea strictae Rivas-Goday in Rivas-Goday & Rivas-Mart. 1963 vegetation class (de Foucault, 2012).

Nomenclatural synonyms were corrected according to the TAXREF v8.0 referential (Gargominy *et al.*, 2014). Subspecies were regrouped by species and due to identification uncertainty we merged *Festuca nigrescens* and *Festuca rubra* species into *Festuca nigrescens* agg. Finally, some species commonly identified as difficult to distinguish between (especially as they often lacked flowers at the moment of the surveys) were regrouped (both in the historical and recent relevés but for this approach only, see the list above).

<i>Alchemilla alpina</i>	}	<i>Alchemilla alpina</i> agg.
<i>Alchemilla catalaunica</i>		
<i>Alchemilla saxatilis</i>		
<i>Alchemilla colorata</i>	}	<i>Alchemilla flabellata</i> agg.
<i>Alchemilla flabellata</i>		
<i>Alchemilla hybrida</i>		
<i>Alchemilla xanthochlora</i>		
<i>Campanula rotundifolia</i>	}	<i>Campanula scheuchzeri</i> agg.
<i>Campanula scheuchzeri</i>		
<i>Campanula</i> sp.		

<i>Euphrasia minima</i>	}	<i>Euphrasia</i> sp. agg.
<i>Euphrasia salisburgensis</i>		
<i>Euphrasia</i> sp.		
<i>Euphrasia stricta</i>		
<i>Galium pumilum</i>	}	<i>Galium</i> sp. agg.
<i>Galium saxatile</i>		
<i>Galium</i> sp.		
<i>Jasione laevis</i>	}	<i>Jasione laevis</i> agg.
<i>Jasione montana</i>		
<i>Jasione</i> sp.		
<i>Pedicularis mixta</i>	}	<i>Pedicularis pyrenaica</i> agg.
<i>Pedicularis pyrenaica</i>		
<i>Viola biflora</i>	}	<i>Viola</i> sp. agg.
<i>Viola bubanii</i>		
<i>Viola canina</i>		
<i>Viola cornuta</i>		
<i>Viola palustris</i>		
<i>Viola riviniana</i>		
<i>Viola rupestris</i>		
<i>Viola</i> sp.		

Statistical analyses

Simpson dissimilarity indexes were calculated as $D = \min(b, c) / (\min(b, c) + a)$ with a the number of shared species, b the number of species only found on one of the compared units, c the number of species only found on the other of the compared units.

All statistical analyses in this study were performed with R version 3.0.2 (R Development Core Team, 2008). We used the package *mgcv* (Wood, 2014) for the GAM analysis, with the Restricted Maximum Likelihood Estimation (REML) of the smoothing parameters and by default low rank isotropic smoothers for all explanatory variables. The package *vegan* (Oksanen *et al.*, 2013) was used for the RDA and the CA, *simba* (Jurasinski & Retzer, 2012) for the comparison of the Simpson dissimilarity indexes and *labdsv* (Roberts, 2013) for the computation of the species occurrence frequencies.

References

- De Foucault, B. (2012) Contribution au prodrome des végétations de France : les Nardetea strictae Rivas Goday in Rivas Goday & Rivas-Mart. 1963. *Journal de Botanique de la Société Botanique de France*, **59**, 241–344.
- Gargominy, O., Tercerie, S., Régnier, C., Ramage, T., Schoelinck, C., Dupont, P., Vandel, E., Daszkiewicz, P. & Poncet, L. (2014) *TAXREF v8.0, référentiel taxonomique pour la France : méthodologie, mise en oeuvre et diffusion*, Paris.
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: The physical science basis*, (ed. by S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, and H.L. Miller) Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.

- Jurasinski, G. & Retzer, V. (2012) A Collection of functions for similarity analysis of vegetation data (simba).
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. & Wagner, H. (2013) vegan: Community Ecology Package.
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. Available at: <http://www.r-project.org>. (Accessed: 29th September 2014).
- Roberts, D.W. (2013) labdsv: Ordination and Multivariate Analysis for Ecology.
- Wood, S. (2014) Mixed GAM Computation Vehicle with GCV/AIC/REML smoothness estimation (mgcv).

Appendix S2. List of the species acronyms.

ACHMIL	<i>Achillea millefolium</i>	ERYBOU	<i>Eryngium bourgatii</i>	PLAMED	<i>Plantago media</i>
AGRCAP	<i>Agrostis capillaris</i>	EUPSP.	<i>Euphrasia</i> sp.	PLASP.	<i>Plantago</i> sp.
AGRUP	<i>Agrostis rupestris</i>	FESESK	<i>Festuca eskia</i>	POAALP	<i>Poa alpina</i>
AJUREP	<i>Ajuga reptans</i>	FESNIG	<i>Festuca nigrescens</i> agg.	POACHA	<i>Poa chaixii</i>
ALCFLA	<i>Alchemilla flabellata</i>	GALANI	<i>Galium anisophyllum</i>	POASUP	<i>Poa supina</i>
ALGER	<i>Alopecurus gerardi</i>	GALPUM	<i>Galium pumilum</i>	POLALP	<i>Polygala alpestris</i>
ANDCAR	<i>Androsace carnea</i>	GALSAX	<i>Galium saxatile</i>	POLAVI	<i>Polygonum aviculare</i>
ANEALP	<i>Anemone alpina</i>	GALSP.	<i>Galium</i> sp	POLSER	<i>Polygala serpyllifolia</i>
ANEPUL	<i>Anemone pulsatilla</i>	GALVER	<i>Galium verum</i>	POTERE	<i>Potentilla erecta</i>
ANTDIO	<i>Antennaria dioica</i>	GENCAM	<i>Gentianella campestris</i>	PRIELA	<i>Primula elatior</i>
ARNMON	<i>Arnica montana</i>	GEUPYR	<i>Geum pyrenaicum</i>	PRUVUL	<i>Prunella vulgaris</i>
AVEFLE	<i>Avenella flexuosa</i>	HELSED	<i>Helictotrichon sedenense</i>	RANGOU	<i>Ranunculus gouanii</i>
BELVAR	<i>Bellardiochloa variegata</i>	HIEHYP	<i>Hieracium x hypeurium</i>	RANPYR	<i>Ranunculus pyrenaicus</i>
BISOFF	<i>Bistorta officinalis</i>	HYPOMAC	<i>Hypochoeris maculata</i>	RANREP	<i>Ranunculus repens</i>
BUPRAN	<i>Bupleurum ranunculoides</i>	HYPRIC	<i>Hypericum richeri</i>	RHOFR	<i>Rhododendron ferrugineum</i>
CALVUL	<i>Calluna vulgaris</i>	JASCRI	<i>Jasione crispa</i>	RUMACE	<i>Rumex acetosa</i>
CAMSCH	<i>Campanula scheuchzeri</i>	JASLAE	<i>Jasione leavis</i>	SCOPYR	<i>Scorzoneroidea pyrenaica</i>
CARCAR	<i>Carex caryophyllaea</i>	LEOHIS	<i>Leontodon hispidus</i>	SERTIN	<i>Serratula tinctoria</i>
CARDEF	<i>Carduus defloratus</i>	LEUVUL	<i>Leucanthemum vulgare</i>	SIDHYS	<i>Sideritis hyssopifolia</i>
CARPRA	<i>Cardamine pratensis</i>	LOTCOR	<i>Lotus corniculatus</i>	STEGRA	<i>Stellaria graminea</i>
CARPYR	<i>Carex pyrenaica</i>	LUZCAM	<i>Luzula campestris</i>	TARSP.	<i>Taraxacum</i> sp.
CARVAG	<i>Carex vaginata</i>	LUZPED	<i>Luzula pediformis</i>	THEPYR	<i>Thesium pyrenaicum</i>
CERFON	<i>Cerastium fontanum</i>	LUZSP.	<i>Luzula</i> sp.	THYPRA	<i>Thymus praecox</i>
CERSP.	<i>Cerastium</i> sp	NARSTR	<i>Nardus stricta</i>	THYPUL	<i>Thymus pulegioides</i>
CIRACA	<i>Cirsium acaulon</i>	ONOCRI	<i>Ononis cristata</i>	TRIALP	<i>Trifolium alpinum</i>
CIRERI	<i>Cirsium eriophorum</i>	PHLALP	<i>Phleum alpinum</i>	TRIPRA	<i>Trifolium pratense</i>
COLMON	<i>Colchicum montanum</i>	PHYHEM	<i>Phyteuma hemisphaericum</i>	TRIREF	<i>Trifolium repens</i>
CONMAJ	<i>Conopodium majus</i>	PILLAC	<i>Pilosella lactucella</i>	VACMYR	<i>Vaccinium myrtillus</i>
CRONUD	<i>Crocus nudiflorus</i>	PILOFF	<i>Pilosella officinarum</i>	VACULI	<i>Vaccinium uliginosum</i>
CRUGLA	<i>Cruciata glabra</i>	PIMSAX	<i>Pimpinella saxifraga</i>	VERCHA	<i>Veronica chamaedrys</i>
DIADEL	<i>Dianthus deltoideus</i>	PLAALP	<i>Plantago alpina</i>	VEROFF	<i>Veronica officinalis</i>
ENDPYR	<i>Endressia pyrenaica</i>	PLALAN	<i>Plantago lanceolata</i>	VERSER	<i>Veronica serpyllifolia</i>
EPIPYR	<i>Epikeros pyrenaicus</i>			VIOSP.	<i>Viola</i> sp.
ERIUNI	<i>Erigeron uniflorus</i>				

Chapitre 4
Effets d'apports d'azote et de modifications
microclimatiques sur le fonctionnement
d'une pelouse subalpine pyrénéenne

4.1. Introduction

L'enrichissement expérimental en azote de pelouses acidiphiles subalpines a montré la capacité de la végétation à répondre à une augmentation de la disponibilité en nutriments. En effet, alors que la croissance de la végétation de ces milieux était supposée limitée par les basses températures plus que par la disponibilité en nutriments, des études pionnières ont montré une réponse rapide de la végétation après des apports de 40 à 250 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Bowman *et al.*, 1993; Körner *et al.*, 1997; Heer & Körner, 2002). Par la suite, des réponses de la végétation à des doses d'azote plus réalistes (entre 5 et 25 kg N ha⁻¹ an⁻¹) ont été observées (Bowman *et al.*, 2006; Bassin *et al.*, 2007, 2013) : augmentation de la biomasse totale, de la biomasse et l'abondance de certaines espèces (notamment parmi les *Carex*) et changements dans la composition et la diversité de la communauté. Ainsi, des apports d'azote faibles à modérés entraînent une réponse relativement rapide de la structure de la végétation des pelouses acides subalpines, et ce malgré un environnement contraignant (températures basses et saison de végétation courte). Cependant, de nombreuses zones d'ombres demeurent quant aux effets des dépôts atmosphériques azotés sur ces habitats. Parmi les recommandations établies en 2011 par un groupe d'experts européen (*The European Nitrogen Assessment*, Sutton *et al.*, 2011) figuraient (i) la mise en place de nouvelles expérimentations d'apport d'azote dans des habitats vulnérables, en particulier dans les régions exposées à des dépôts relativement faibles ; (ii) l'étude des effets relatifs des formes réduites et oxydées de l'azote ; et (iii) l'étude de l'interaction avec les autres facteurs des changements globaux (en particulier le changement climatique, le changement d'usage des terres et les autres polluants ; Dise *et al.*, 2011).

Le massif pyrénéen reçoit des quantités d'azote modérées (8 à 15 kg N ha⁻¹ an⁻¹, voir **section 2.1**) par rapport au reste de l'Europe. Une expérimentation apportant des quantités d'azote comparables à une pelouse subalpine pyrénéenne permettra de mieux connaître les impacts de ces dépôts modérés d'azote sur ces milieux contraints et vulnérables.

Plusieurs études ont montré que les plantes en général, et également les plantes des milieux d'altitude, utilisent les deux formes de l'azote minéral (nitrate et ammonium) mais avec une préférence pour l'une ou l'autre suivant les espèces (e.g. Miller and Bowman, 2003, 2002 pour les plantes alpines) et de façon complexe (influence des espèces voisines, de la période dans la saison de végétation et d'autres facteurs internes de la plante ou de son environnementaux ; Britto and Kronzucker, 2013; Miller *et al.*, 2007; Pornon *et al.*, 2007). Le rapport entre les deux formes de l'azote dans les dépôts atmosphériques est donc susceptible d'influencer la

composition des communautés végétales. Si peu d'études ont porté sur les formes de l'azote dans les apports, elles confirment tout de même que la réponse de la végétation varie en fonction du rapport entre azote réduit et oxydé (Nordin *et al.*, 2006; van den Berg *et al.*, 2008; Gaudnik, 2011).

Les dépôts atmosphériques azotés interviennent dans un contexte de changements globaux (en particulier climatique), il est donc essentiel d'envisager leurs effets en interaction avec les autres facteurs majeurs de ces changements. Ainsi, l'expérimentation menée dans les Alpes suisses a montré que si les pelouses subalpines semblent très affectées par les apports d'azote, elles sont en revanche peu sensibles à la concentration en un autre polluant de l'air, l'ozone troposphérique (Bassin *et al.*, 2007, 2013). Peu d'études portent sur l'interaction entre les apports atmosphériques d'azote et le changement climatique. Deux études dans des écosystèmes prairiaux (une prairie annuelle californienne et une steppe mongolienne) suggèrent que les effets sont indépendants (additifs) sur la diversité et la phénologie des communautés végétales (Zavaleta *et al.*, 2003; Xia & Wan, 2013). Dans les milieux d'altitude, la minéralisation de la matière organique du sol est ralentie en raison des basses températures ce qui entraîne une faible disponibilité en nutriments (Körner, 1999). L'élévation des températures pourrait donc favoriser la minéralisation et ainsi participer à une augmentation de la disponibilité en azote du sol conjointement avec les apports atmosphériques d'azote. Cependant, l'interaction entre dépôts azotés et changements globaux peut varier d'un écosystème à l'autre et en fonction du type de modifications climatiques (Porter *et al.*, 2012). Il est donc important de développer une approche multifactorielle sur les milieux d'altitude.

Notre étude a été conçue pour répondre aux objectifs suivants : (i) caractériser le devenir de l'azote des dépôts atmosphériques dans l'écosystème (plante-sol), (ii) identifier les effets de doses réalistes variées d'azote, (iii) préciser les effets d'une proportion inversée entre formes réduite et oxydée de l'azote et (iv) déterminer d'éventuelles interaction entre dose d'azote et changement climatique.

4.2. Matériel & Méthodes

4.2.1. Description du site

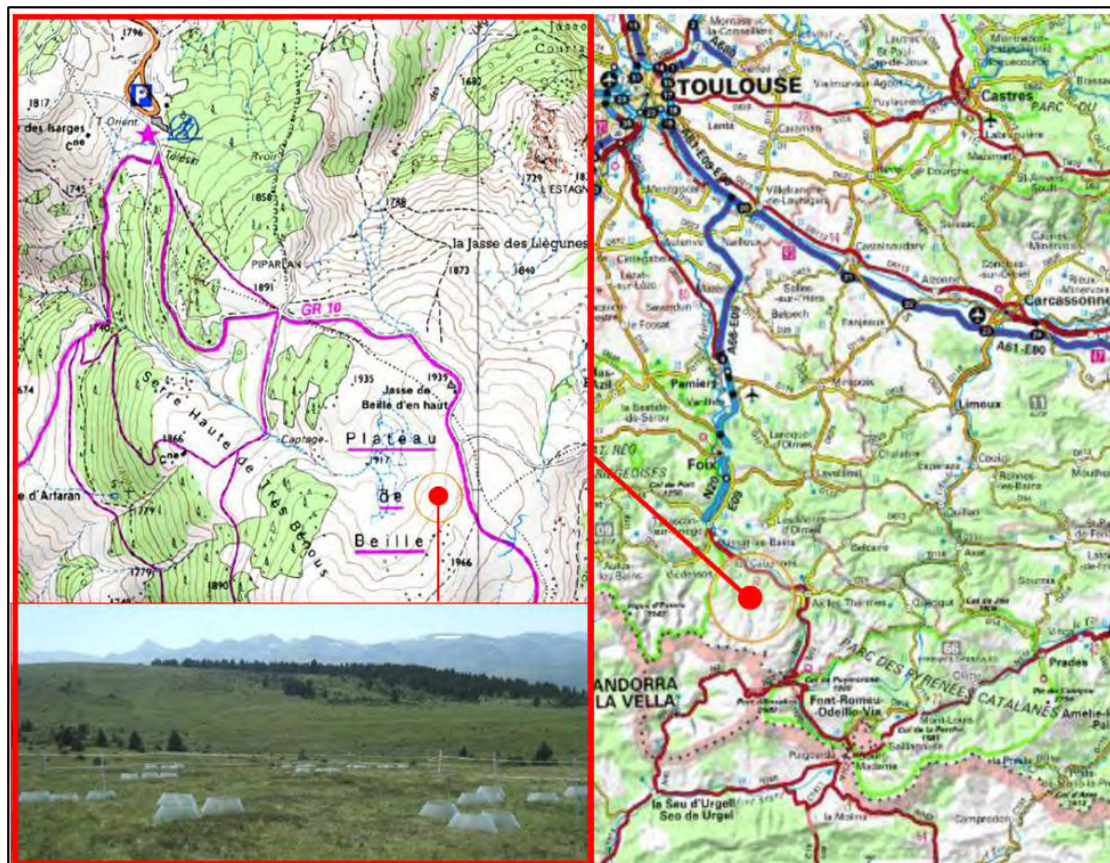


Figure 4.1. Localisation du site expérimental du Plateau de Beille.

L'étude a été menée dans une pelouse acide subalpine du plateau de Beille ($42^{\circ}42'44''\text{N}$, $1^{\circ}42'17''\text{E}$, 1940 m d'altitude), en Ariège (09 ; **Figure 4.1**). Le site a été retenu à la fois pour son accessibilité et pour les faibles retombées d'azote qu'il reçoit : $8 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ contre $11\text{-}15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ pour les autres sites (voir section 2.1). Les températures moyennes et les précipitations mensuelles pour les trois années de l'expérimentation sont présentées sur la **Figure 4.2**.

Le sol est de type brun ocre podzolique humifère en cours d'évolution sur un gneiss riche en biotite et muscovite. Des prélèvements le long de deux profils verticaux sur le site ont été réalisés en septembre 2013 (**Tableau 4.1**).

Tableau 4.1. Caractéristiques du sol. Les échantillons ont été prélevés en septembre 2013 sur deux profils verticaux puis séchés à l'air ambiant en laboratoire. Les analyses ont été réalisées par le LAS (Arras, France).

	FOSSE 1				FOSSE 2			
	H0-5	H5-25	H25-30	H30+	H0-5	H5-25	H25-30	H30+
Elements grossiers								
cailloux g	0	17.7	12.5	39.3	0	23.1	19.3	55.3
Cailloux (>0,5 cm) g/kg	0	17.2	12.5	23.1	0	23.1	14.4	33.7
graviers g	0	18.1	5.4	61.8	0	0.9	21.2	52.6
graviers (0,2-0,5 cm) g/kg	0	17.6	5.41	36.3	0	0.899	15.8	32.1
masse seche air g	935	1030	997	1700	972	1000	1340	1640
Terre fine (<2mm) g/kg	1000	965	982	941	1000	976	970	934
Granulométrie								
Argile (< 2 µm) g/kg	445	173	88	29	307	134	55	43
Limons fins (2/20 µm) g/kg	300	134	136	133	229	122	74	91
Limons grossiers (20/50 µm) g/kg	100	100	119	130	145	98	101	111
Sables fins (50/200 µm) g/kg	88	205	214	237	194	209	250	206
Sables grossiers (200/2000 µm) g/kg	67	388	443	471	125	437	520	549
Humidité								
Humidité à 105°C g/kg	96.9	32.4	15.3	15.9	61.4	23.8	11.7	26
Humidité équivalente g/100g	99	27.6	21.8	15.1	64	27.4	11.6	12.6
pH								
pH eau	4.81	4.84	5.04	5.34	4.6	4.41	4.72	5.03
pH KCl	3.94	4.09	4.29	4.59	3.72	3.49	3.77	4.27
Combustion sèche								
Matière organique g/kg	456	183	55.4	22.7	308	129	30.6	46.5
Carbone (C) total g/kg	264	106	32	13.1	178	74.3	17.7	26.9
Azote (N) total g/kg	14.5	5.28	1.44	0.622	9.14	3.99	0.985	1.14
Azote minéral								
Azote ammoniacal mg/kg	87.8	16.6	5.32	4.32	36.8	9.46	5.97	5.43
Azote nitrique mg/kg	2.53	<0,75	<0,75	<0,75	<0,75	<0,75	<0,75	<0,75
Extr. au chl. de cobaltihexamine								
Aluminium (Al) cmol+/kg	1.44	3.48	1.41	0.714	1.39	3.03	1.99	1.75
Calcium (Ca) cmol+/kg	16	0.438	0.0768	0.0706	7.29	1.25	0.227	0.15
Fer (Fe) cmol+/kg	0.0451	0.028	0.0081	0.0138	0.0586	0.0592	0.0385	0.0328
Magnésium (Mg) cmol+/kg	2.59	0.147	0.0287	0.011	2.39	0.488	0.0708	0.0314
Manganèse (Mn) cmol+/kg	0.255	<0,005	<0,005	<0,005	0.14	<0,005	<0,005	<0,005
Potassium (K) cmol+/kg	2.86	0.215	0.0376	<0,02	1.3	0.261	0.0857	0.0376
Sodium (Na) cmol+/kg	0.178	0.0438	0.0195	0.0124	0.0386	0.0219	0.0129	0.0157
CEC cmol+/kg	20.9	3.99	1.29	<1	11.9	5.17	2.08	<1
Protons (H+) cmol+/kg	1.99	0.312	0.12	<0,05	1.4	1.06	0.384	0.144

L'emplacement a été retenu selon les critères suivants : zone homogène de superficie suffisante pour accueillir les placettes expérimentales, non intensivement pâturée, de pente faible et accueillant une végétation de type nardaie avec au moins 5 espèces parmi celles de la liste suivante : *Agrostis capillaris* L., *Calluna vulgaris* (L.) Hull, *Campanula rotundifolia* L., *Carex pilulifera* L., *Danthonia decumbens* (L.) DC., *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin., *Festuca rubra* L./ovina L., *Galium saxatile* L., *Luzula campestris* (L.) DC., *Nardus stricta* L., *Polygala* spp. L.,

Potentilla erecta (L.) Räuschel et *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. La végétation sur ce site est donc comparable aux communautés étudiées dans le Chapitre 3 et dans plusieurs études menées à l'échelle européenne sur des prairies acides de plaine (programme *BEGIN – Biodiversity of European Grasslands : the Impact of atmospheric Nitrogen deposition*). Ces pelouses appartiennent à l'alliance du *Nardion strictae* Braun-Blanq. 1926, de la classe *Caricetea curvulae* (Braun-Blanq. 1948 nom. cons. propos.), à l'habitat prioritaire 6230 Natura 2000 et à la classification typologique EUNIS E4.3 (Davies *et al.*, 2004).

Le plateau est pâturé par des vaches, des chevaux et des moutons. La zone étudiée correspond à une zone de passage des troupeaux mais pas à une zone de repos, le pâturage y est donc faible à modéré. L'aire expérimentale a été clôturée en Juin 2012 afin d'exclure le pâturage durant toute la durée de l'expérimentation.

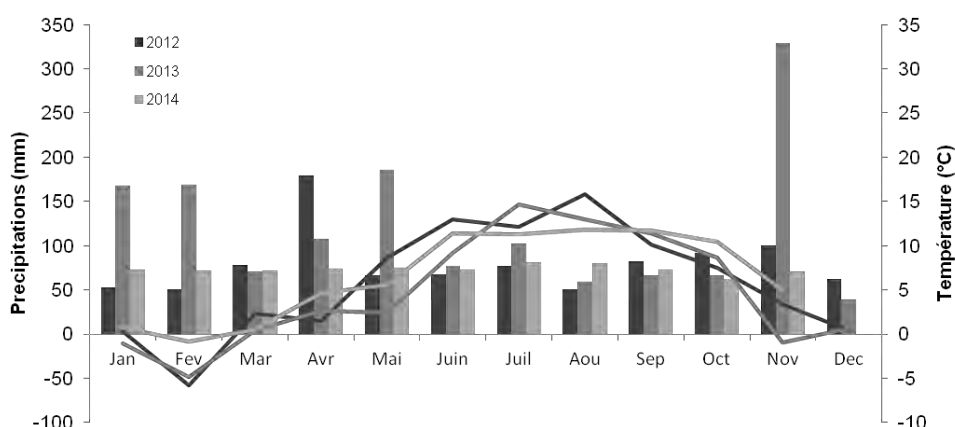


Figure 4.2. Diagramme ombrothermique (P (histogramme) = 10 T (courbe)) de la station météorologique du plateau de Beille (1781m, Météo-France).

4.2.2. Traitements expérimentaux

a - Apports d'azote

Quatre niveaux d'azote ont été apportés : 0 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (contrôle, N0), 5 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (apport considéré comme faible, N5), 10 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (apport modéré, N10) et 30 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (apport élevé, N30, **Figure 4.3**). Les apports ont été réalisés entre Juin et Octobre, via 3 applications en 2012, 5 applications en 2013 et 4 applications en 2014. Chaque placette de 1 m² est pulvérisée avec 1 L de solution par application. Les contrôles ont reçu un volume équivalent d'eau déionisée. Les placettes sont pulvérisées dans un ordre différent (et donc à heure de la journée différente) à chaque application. Les solutions apportées contiennent 1/3 d'azote sous

forme nitrate (NO_3^- , provenant de NH_4NO_3) et $\frac{2}{3}$ d'azote sous forme ammonium (NH_4^+ , provenant de NH_4NO_3 et NH_4Cl).

Un traitement « apport modéré » ($10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) a été réalisé avec un ratio inversé entre azote réduit et oxydé (N10IR): $\frac{1}{3}$ d'azote sous forme NH_4^+ , provenant de NH_4NO_3 et $\frac{2}{3}$ d'azote sous forme de nitrate (NO_3^- , provenant de NH_4NO_3 et KNO_3) (**Figure 4.3**). Cette proportion est un compromis entre le ratio observé dans les dépôts atmosphériques réels et une différence suffisamment marquée par rapport au ratio N oxydé et N réduit des autres apports de notre étude.

b - Changement climatique

Les traitements 0N, 5N et 30N ont été combinés factoriellement à deux traitements : sans changement climatique (contrôles, N0 C, N5 C et N30 C) et avec changement climatique (N0 W, N5 W et N30 W). L'expérimentation comporte donc un total de 8 combinaisons de traitements différentes répétées sur 6 blocs (**Figure 4.3**).

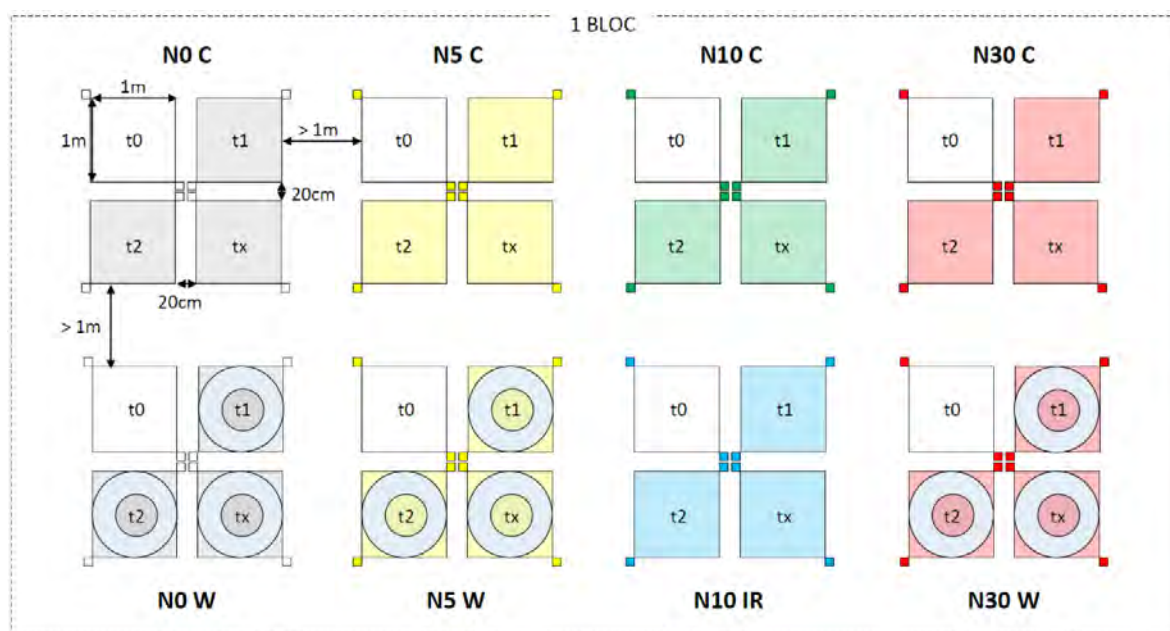


Figure 4.3. Design expérimental. Chaque bloc (6 au total) comprend 8 traitements répartis aléatoirement. Chaque traitement comprend une placette laissée vierge (t_0) et 3 placettes recevant un traitement et destinées aux prélèvements destructifs 1 an (t_1), 2 ans (t_2) et n années (t_x) après le début de l'expérimentation (les placettes sont elles aussi réparties aléatoirement). Chaque traitement d'apport d'azote est symbolisé par une couleur : contrôle (blanc, N0), N faible (jaune, N5), N modéré à majorité de N réduit (vert, N10 C) ou à majorité de N oxydé (bleu, N10 IR) et N élevé (rouge, N30). La présence de mini-serres ouvertes est indiquée : sans (C) et avec (W).

Le changement climatique est simulé par l'installation sur les placettes d'une mini-serre ouverte, de forme conique d'un mètre de diamètre à la base et 64 cm de diamètre au sommet. Ces serres sont en Sun-Lite® HP (Solar Components Corporation, Manchester, USA). Ce matériau offre une bonne transmission de la lumière visible (environ 86%) mais intercepte une partie des UV (transmission de 5 % à 330 nm et 85% à 380 nm). Il offre une faible transmission du rayonnement infrarouge (<5%) assurant un effet de serre efficace et a déjà été utilisé par d'autres auteurs (Marion *et al.*, 1997). Les serres sont mises en place après la fonte complète de la neige (début Juin) et retirées peu avant les premières chutes de neige (fin Octobre). L'effet des serres sur la température et l'humidité de l'air dans la canopée (à environ 10 cm au dessus de la surface du sol) et sur la température du sol (à 15 cm de profondeur) a été mesuré la première saison (2012) par des enregistreurs (Lascar EL-USB-2+, Lascar Electronics) toutes les 30 minutes à l'intérieur et à l'extérieur des serres. La température et d'humidité du sol à 5 cm de profondeur ont été mesurées en 2013 à l'aide d'un humidimètre portable (HD2, IMKO) sur une placette par bloc, un transect de 3 points de mesure à l'extérieur et 3 points de mesure à l'intérieur de la serre.

Les serres ont entraîné un réchauffement moyen significatif de 1,3°C sur un nyctémère (Wilcoxon test, $p = 0,048$) et de 2°C ($p = 0,024$) sur la nyctipériode (entre 7h et 22h). Le réchauffement obtenu est très similaire à celui obtenu par l'utilisation de systèmes expérimentaux semblables en milieu alpin (Suzuki & Kudo, 1997) et correspond aux prédictions les plus faibles de réchauffement global pour l'année 2100 (IPCC, 2007). Durant les nuits, la température à l'intérieur des serres n'est pas modifiée. Le réchauffement généré par les serres a lieu dans l'après-midi (**Figure 4.4**). Lors des journées les plus chaudes et ensoleillées, les serres peuvent engendrer de très fortes élévations de température : 50°C contre 35,5°C pour les parcelles contrôles. Aucun écart entre l'air ambiant et l'intérieur des serres n'est mesuré pour les journées les plus froides et les moins ensoleillées. Les serres simulent donc à la fois l'augmentation de température et l'augmentation de variabilité de la température de l'air (Aronson & McNulty, 2009). Aucun effet significatif sur le taux d'humidité de l'air n'a été observé.

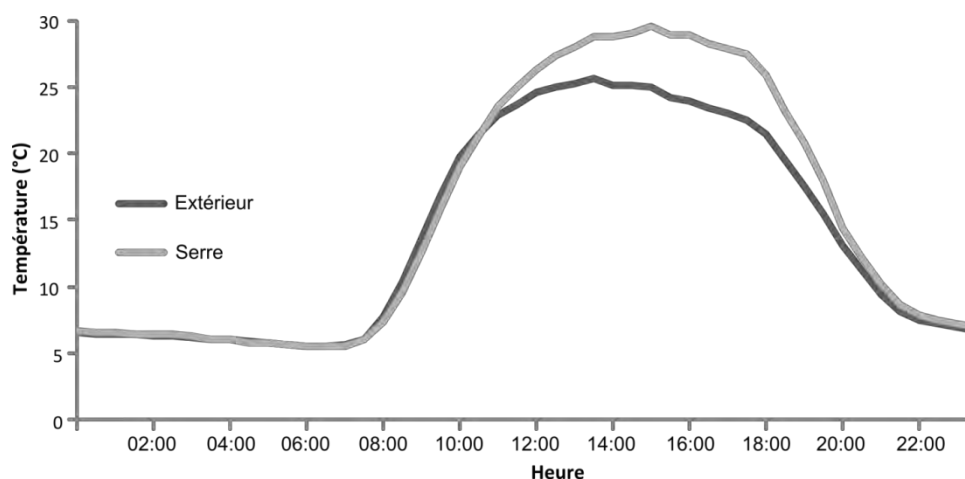


Figure 4.4. Moyennes par heure des températures enregistrées à l'extérieur et à l'intérieur des serres durant l'été 2012.

Aucun effet significatif des serres sur la température du sol à 5 et à 15cm de profondeur n'a été détecté. La température du sol à 5 cm de profondeur a été mesurée en début et fin de matinée, lorsque l'effet potentiel des serres sur la température de l'air ne s'est pas encore produit. Il n'est donc pas exclu qu'un réchauffement des premiers centimètres de sol ait lieu en milieu et/ou fin d'après-midi. Un effet négatif des serres sur l'humidité du sol à 5 cm de profondeur a été observé (Wilcoxon test, $p = 0,029$ et $p < 0,001$). Cet effet pourrait provenir de l'interception d'une partie des précipitations par les serres de forme conique.

c - Marquage ^{15}N

Afin de suivre le devenir de l'azote apporté, l'azote des traitements N5 C, N10 C, N30 C, N5 W et N30 W a été marqué avec l'isotope stable ^{15}N . Etant donné les quantités d'azote apportées, un marquage au ^{15}N à 99% n'était pas envisageable. Nous avons donc estimé l'enrichissement minimal permettant de détecter l'azote exogène une fois dilué dans les différents compartiments de l'écosystème : abondance en ^{15}N de 42% pour N5 C et N5 W, 21,5% pour N10 C et 7,5% pour N30 C et N30 W. Les placettes t1 ont reçu de l'azote marqué au ^{15}N jusqu'au moment de la récolte. Les placettes t2 ont reçu de l'azote marqué au ^{15}N en 2012 et 2013 mais non marqué en 2014 (**Figure 4.5**). L'absence de marquage isotopique la dernière année permettra d'étudier le recyclage de l'azote exogène d'une année sur l'autre.

Les prélèvements de la végétation et de sol ont été réalisés entre les 10 et 15 août 2013 sur les placettes t1 et entre les 5 et 13 août 2014 sur les placettes t2. Les placettes récoltées en 2013 (t1) avaient ainsi reçu 8, 16 et 48 kg N ha⁻¹ et celles récoltées en 2014 (t2) 13, 26 et 78 kg N ha⁻¹ au moment des prélèvements (dans les traitements N5, N10 et N30 respectivement).

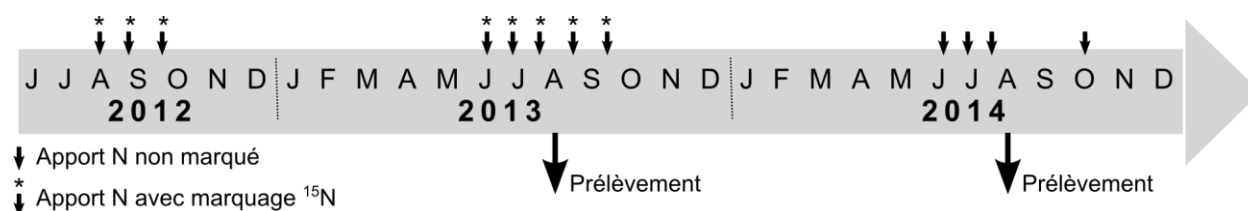


Figure 4.5. Chronologie des apports d'azote, du marquage ^{15}N de ces apports et des prélèvements.

4.2.3. Echantillonnage et analyse de la végétation

a - Relevés floristiques par la méthode des points-contact

La composition floristique a été évaluée par la méthode des points-contacts. Un cadre de 1 m² quadrillé tous les 10 cm (soit 121 points-contacts) est posé sur la placette. A l'aide d'une aiguille graduée de 4 mm de diamètre la hauteur moyenne de la végétation ainsi que toutes les espèces touchant l'aiguille ont été notées pour chaque point. Cette opération a été réalisée sur toutes les placettes en Juillet 2012 puis sur les placettes t1 en Juillet 2013 et les placettes t2 en Juillet 2014. La hauteur moyenne de la végétation et le recouvrement de chaque espèce ont été estimés.

b - Prélèvements des parties aériennes

La végétation aérienne a été coupée au ras du sol sur un carré de 70 cm de côté au centre de la placette et triée *in situ* en 11 groupes. Quatre de ces groupes correspondent aux 4 espèces les plus abondantes sur le site : *Nardus stricta*, *Calluna vulgaris*, *Carex caryophyllea* et *Potentilla erecta*. Les 7 autres groupes correspondent aux autres Poacées (*Festuca eskia*, *Festuca nigrescens*, *Agrostis capillaris*,...), *Vaccinium* sp., *Luzula* sp., Fabacées (*Trifolium alpinum*, *Lotus corniculatus*), autres eudicotylédones (*Pilosella officinarum*, *Jasione perennis*, *Gentiana pyrenaica*, *Galium saxatile*,...), autres monocotylédones (*Crocus* sp., *Pseudorchis albida*,...) et végétaux non vasculaires (mousses, lichens).

c - Prélèvements des parties racinaires

Immédiatement après le prélèvement de la biomasse aérienne, 2 carottes de 8cm de diamètre et 15cm de profondeur ont été prélevées sur deux points diagonalement opposés de la placette. Les 2 prélèvements ont été regroupés et les racines séparées du sol *in situ* par lavage à l'eau.

d - Préparation et analyses élémentaires

Les parties aériennes et racinaires ont été stockées dans des enveloppes papier ouvertes laissées à l'air libre jusqu'au laboratoire où elles ont été séchées 48h (pour les parties aériennes) ou 72h (pour les parties racinaires) à 60°C, puis pesées. Les échantillons ont ensuite été broyés dans un broyeur-mélangeur à lames (Blender 8010ES WaringTM, Mixer MB800 KinematicaTM), puis un sous-échantillon a été broyé plus finement dans un vibro-broyeur (Tissue Lyser QiagenTM). Les échantillons issus des traitements sans marquage isotopique ont été analysés pour la teneur en C et N (Analyseur élémentaire NA2100 CE InstrumentTM, Plateforme d'analyse, Toulouse). Les échantillons issus des traitements avec marquage isotopique ont été analysés pour leurs teneurs en C et N (exprimées en % de matière sèche) et leur abondance en ¹⁵N (Spectromètre de masse IsoprimeTM couplé à un auto-analyseur élémentaire EA EuroVectorTM, Laboratoire B&PMP, Montpellier). L'abondance naturelle en ¹⁵N a été déterminée pour quatre échantillons de racines et de parties aériennes des quatre principaux groupes de végétaux (*C. vulgaris*, *N. stricta*, *C. caryophylllea* et autres eudicotylédones) provenant des placettes contrôle (N0 C).

4.2.4. Echantillonnage et analyse du sol

Immédiatement après le prélèvement de la biomasse aérienne, 2 lots de 10 carottes de sol de 2cm de diamètre sur 15cm de profondeur ont été prélevés sur toute la placette. Les 10 carottes ont été poolées dans chaque lot. Un lot a été conservé au frais puis congelé (-26°C) au laboratoire avant d'être analysé pour l'azote minéral (NO₃⁻ et NH₄⁺, Celesta-Lab, Mauguio). L'autre lot est séché à l'air libre puis 72h à 40°C, tamisé à 2 mm et pesé. Un sous-échantillon est analysé pour le pH_{eau} et le pH_{KCl} (20 g de sol sec par analyse, norme ISO 10390, Plateforme d'analyse, Toulouse). Un second sous-échantillon (environ 50 g de sol sec) est broyé (Broyeur à billes S1000 RetschTM) puis tamisé à 250 µm pour l'analyse des teneurs en C et N (Analyseur élémentaire NA2100 CE InstrumentTM, Plateforme d'analyse, Toulouse) des échantillons des traitements sans marquage ¹⁵N et pour l'analyse en C, N et ¹⁵N (Spectromètre de masse IsoprimeTM couplé à un auto-analyseur élémentaire EA EuroVectorTM, Laboratoire B&PMP, Montpellier) des traitements avec marquage ¹⁵N. L'abondance naturelle en ¹⁵N du sol a été déterminée à partir de quatre échantillons provenant de placettes contrôle (N0 C).

4.2.5. Analyse des données

a - Biomasses, recouvrements et hauteur de la végétation

L'importante hétérogénéité spatiale de la végétation est susceptible de masquer les effets des traitements sur la biomasse, la hauteur et le recouvrement des espèces ou groupes d'espèces. Nous avons donc testé les effets des traitements sur les changements de biomasse (ΔBiom), de hauteur (ΔHaut) et de recouvrement (ΔRec) dans chaque placette entre le début de l'expérimentation (2012) et le prélèvement de la végétation (2013 et 2014).

L'estimation de la biomasse en début d'expérimentation (2012) ne devant pas être destructive, nous avons utilisé la relation entre biomasse et recouvrement + hauteur moyenne issus des points-contact pour chaque espèce ou groupe d'espèces (**Tableau 4.2**). Ces relations ont été calibrées sur les biomasses mesurées lors des prélèvements 2013 et 2014 associées aux données points-contact correspondantes, puis appliquées aux recouvrements et aux hauteurs de 2012. Seuls les points-contact correspondant au carré central de 70 cm de côté (zone de prélèvement de la biomasse) ont été conservés pour déterminer ces relations. Le groupe des monocotylédones autres que les Poacées, Cypéracées et Juncacées présentant une contribution négligeable à la biomasse totale et ayant une occurrence limitée a été exclu de cette analyse.

Pour les racines, aucune estimation de la biomasse avant le début des traitements n'étant possible, l'effet des traitements a été testé sur les biomasses au moment des prélèvements (et non sur les changements de biomasse depuis le début de l'expérimentation).

Tableau 4.2. Relations entre biomasse (B), recouvrement (R) et hauteur moyenne (H) pour chaque espèce ou groupe. n indique le nombre de placettes utilisés pour la calibration de ces relations.

Groupe	Equation	R^2_{adj}	n
<i>N. stricta</i>	$B = (0,09344 \times R + 0,31439 \times H)^2$	0,975	96
<i>C. vulgaris</i>	$B = (0,29712 \times R + 0,2262 \times H)^2$	0,970	88
<i>C. caryophylla</i>	$B = \exp(0,048508 \times R + 0,118351 \times H)$	0,967	96
<i>P. erecta</i>	$B = (0,84550 \times \log R + 0,03120 \times H)^2$	0,961	90
Fabacées	$B = 0,784 \times R$	0,979	18
Autres eudicotylédones	$B = \exp(0,03422 \times R + 0,11470 \times H)$	0,953	91
Autres Poacées	$B = (0,18318 \times R + 0,18947 \times H)^2$	0,879	66
Non vasculaires	$B = (2,0241 \times \log(R + 1))^2$	0,869	39
<i>Vaccinium sp.</i>	$B = (1,9381 \times \log(R + 1))^2$	0,912	23
<i>Luzula sp.</i>	$B = (0,39881 \times R)^2$	0,788	19

b - Traçage isotopique

L'excès de ^{15}N (en g) dans chaque échantillon a été calculé comme :

$$\text{Excès de } ^{15}\text{N} = \text{Masse}_{\text{éch}} \times [\text{N}]_{\text{éch}} \times (A_{\text{éch}} - A_{\text{naturelle}})$$

où $A_{\text{naturelle}}$ est estimée à partir d'échantillons de chaque type (sol, racines, parties aériennes de différents groupes) provenant de placettes contrôles. L'azote exogène (en g) a été calculé comme : $N_{\text{exo}} = \text{Excès de } ^{15}\text{N} \div (A_{\text{solution}} - A_{\text{naturelle}})$

où $A_{\text{naturelle}}$ de la solution est considérée à 0,0037. L'excès de ^{15}N et la quantité d'azote exogène pour chaque compartiment de la placette ont été ramenés à une surface de 1 m² (exprimés en g m⁻²). La proportion de l'azote exogène retrouvée dans chacun des compartiments (sol, racines et parties aériennes) est exprimée comme le rapport entre N_{exo} et la quantité cumulée d'azote apportée. La teneur en azote exogène par rapport à la teneur en azote total ($N_{\text{exo}}/N_{\text{tot}}$) est exprimée pour chaque compartiment comme le rapport entre N_{exo} et la quantité totale d'azote dans le compartiment.

c - Analyses statistiques

Les effets de la quantité d'azote, de la présence de serre et de leur interaction sur la diversité floristique, les différentes variables de structure et chimie de la végétation et du sol ont été testés par des modèles linéaires à effets mixtes avec la quantité d'azote (variable quantitative) et la présence de serre (variable qualitative) en effets fixes, et le bloc expérimental en effet aléatoire. Le niveau d'apports d'azote à partir duquel un effet est détecté a été testé avec un modèle similaire mais dans lequel la quantité d'azote a été codée en variable qualitative. Les effets de la forme de l'azote ont été testés séparément par des modèles linéaires à effets mixtes avec la forme de l'azote (variable qualitative) en effet fixe et le bloc expérimental en effet aléatoire sur les données des traitements N10C et N10IR uniquement. A l'échelle de l'espèce ou du groupe d'espèce, ces analyses n'ont pas été réalisées sur les groupes présents dans un nombre limité de placettes (*Vaccinium* sp., *Luzula* sp., Fabacées et autres monocotylédones).

Deux analyses de co-correspondance symétriques ont été réalisées : une sur les matrices floristiques (espèces x placettes) des placettes t_1 (relevés de 2012 et 2013) et une sur les matrices floristiques des placettes t_2 (relevés de 2012 et 2014). Les coordonnées des placettes sur les axes 1 et 2 de chaque analyse ont été comparées par un test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon avec échantillons appariés, pour chaque combinaison de traitements, entre le début de l'expérimentation (2012) et l'année de prélèvement (2013 pour les placettes t_1 et 2014 pour les

placettes t2). L'indice de Shannon a été déterminé pour chaque placette, au début de l'expérimentation et au prélèvement, selon la formule $H = -\sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i$ où p_i est la proportion de l'espèce i par rapport au nombre total d'espèces (s). L'équitabilité a ensuite été calculée comme $E = H/\log_2 s$. La différence entre la richesse spécifique, l'indice de Shannon ou l'équitabilité au prélèvement et au début de l'expérimentation a ensuite été calculée afin de pouvoir tester les effets des différents traitements sur la diversité floristique.

Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel *R* (R Development Core Team, 2008). Les indices de Shannon ont été calculés avec le package *vegan* (Oksanen *et al.*, 2013). Les analyses de co-correspondance ont été réalisées avec le package *cocorresp* (Simpson, 2009). Les modèles linéaires à effets mixtes ont été réalisés avec les packages *lme4* (Bates *et al.*, 2014) et *lmerTest* (Kuznetsova *et al.*, 2014).

4.3. Résultats et discussion

4.3.1. Répartition et conservation de l'azote des apports dans l'écosystème

a - Validation du protocole de marquage

L'abondance en ^{15}N des échantillons s'échelonne de 0,3739 à 0,4296 % dans les sols, de 0,4350 à 0,7135 % dans les racines et de 0,4425 à 5,7175 % dans les parties aériennes pour une abondance naturelle de 0,3678 % dans les sols, 0,3680 % dans les racines et 0,3737 % dans les parties aériennes. Le signal obtenu dans les échantillons (très supérieur à l'abondance naturelle) après répartition du ^{15}N apporté entre les compartiments de l'écosystème, les éventuelles pertes et la dilution par la croissance valide notre protocole de marquage.

Tous traitements confondus, plus de 60 % du ^{15}N apporté a été retrouvé dans les trois principaux compartiments de l'écosystème (parties aériennes et racinaires de la végétation, et sol) en 2013 et en 2014 (**Figure 4.6**). Un tel résultat en milieu non contrôlé montre que (i) l'azote pulvérisé sur la végétation est efficacement capté par les feuilles et/ou le sol et (ii) cet azote est conservé dans le système sol-plante d'un cycle de végétation annuel sur l'autre. Un peu moins de 40 % de l'azote apporté n'a pas été retrouvé dans ces 3 compartiments. Ces pertes peuvent correspondre en partie aux flux naturels de perte de l'azote de l'écosystème : entraînement par lessivage (essentiellement du nitrate solubilisé dans la solution du sol) sous l'horizon des 15 premiers cm de sol qui n'a pas été analysé, volatilisation sous forme de NH_3 ou dénitrification sous forme de composés gazeux (N_2O ou N_2). Cependant, une partie de ces pertes

peuvent avoir eu lieu lors des pulvérisations : (i) les gouttelettes les plus fines issues de la nébulisation peuvent avoir été entraînées en dehors des placettes par le vent malgré les précautions prises pour limiter ces pertes et (ii) une petite partie de la solution de marquage a pu adhérer aux parois des pares-vent, n'atteignant pas la végétation ou le sol. Enfin, une partie de ces pertes peut également s'expliquer par le protocole de prélèvement appliqué : (i) la nécromasse (par exemple les gaines basales de *N. stricta* et *F. eskia*) ou la litière (feuilles mortes non décomposées à la surface du sol) n'ont pas été prélevées et peuvent contenir une partie de l'azote exogène non retrouvé, et (ii) de l'azote exogène a pu être perdu lors du lavage des racines.

b - Devenir de l'azote apporté dans l'écosystème

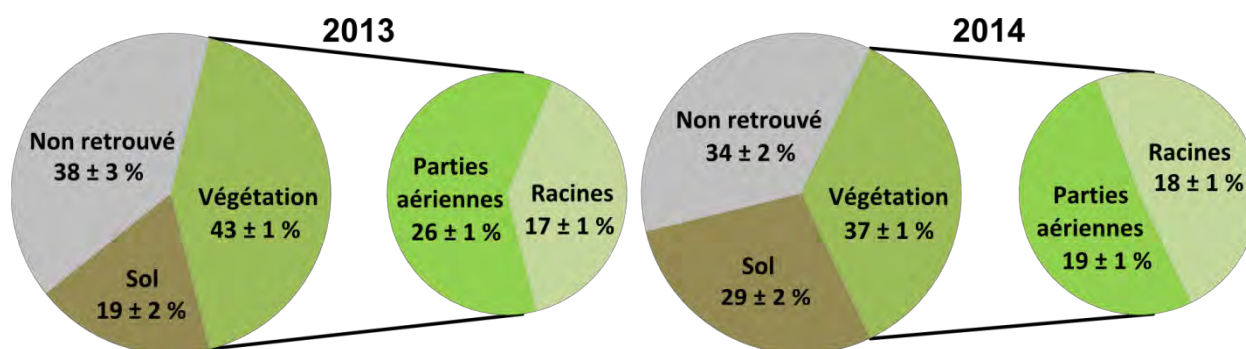


Figure 4.6. Recouvrements (% , moyenne \pm erreur standard) de l'azote exogène dans les principaux compartiments de l'écosystème en moyenne sur tous les traitements en 2013 et en 2014.

Après une année d'apports d'azote marqué au ^{15}N (d'août 2012 à août 2013), 62 ± 3 % (moyenne \pm erreur standard) de cet azote est retrouvé dans l'écosystème (**Figure 4.6**). Ce pourcentage se répartit ainsi : 26 ± 1 % dans les parties aériennes, 17 ± 1 % dans les racines et 19 ± 2 % dans le sol. Les parties aériennes, qui reçoivent directement l'azote exogène, constituent donc le puits de stockage le plus large pour cet azote. En 2014, l'azote apporté n'était pas enrichi en ^{15}N (**Figure 4.5**). L'azote marqué retrouvé lors de l'échantillonnage d'août 2014 correspond donc à l'azote exogène de 2012-2013. Le taux de recouvrement est de 66 ± 2 %, ce qui révèle une très bonne conservation de l'azote dans le système plante-sol. En d'autres termes, l'azote retenu par l'écosystème en 2012-2013 y a été intégralement conservé jusqu'à l'été 2014. Néanmoins, la répartition entre les compartiments est modifiée : 29 ± 2 % de l'azote apporté en 2012-2013 se retrouve en août 2014 dans le sol, 19 ± 1 % dans les parties aériennes et 18 ± 1 % dans les racines (soit 37 ± 1 % dans la végétation ; **Figure 4.6**). Ainsi, il apparaît que l'azote apporté aux feuilles est progressivement transféré vers le sol.

Ces résultats montrent, qu'au moins à court terme, cet écosystème retient les 2/3 de l'azote apporté par voie atmosphérique. La stabilité de la proportion de cet azote retrouvé l'année suivant l'arrêt du marquage suggère qu'une part importante de cet azote pourrait être retenue à long terme dans la végétation et l'horizon racinaire du sol. Après plusieurs décennies d'exposition à des dépôts chroniques d'azote, la pelouse subalpine n'apparaît pas saturée en N (ce qui se traduirait par des pertes majeures d'azote exogène, notamment par lessivage) mais continue à piéger et conserver une part importante de l'azote qu'elle reçoit. Cette capacité élevée de conservation de l'azote a aussi été observée dans des habitats relativement proches. Friedrich *et al.* (2011) ont observé une forte immobilisation de l'azote exogène dans le système végétation-sol et des pertes par lessivage négligeables dans une lande à *C. vulgaris* (Allemagne). Le réexamen d'une expérimentation de traçage isotopique de l'azote dans une pelouse alpine à *Carex curvula* (Autriche, 2300m d'altitude) 28 ans après le marquage d'un apport unique de 100 kg N ha⁻¹ (sous forme solide) a révélé une conservation élevée de l'azote apporté dans le système sol-plante (45%) dont 40% dans les 10 premiers centimètres de sol (Gerzabek *et al.*, 2004). Par ailleurs, Bassin *et al.* (2015) rapportent des taux de recouvrement très proches dans une pelouse subalpine des Alpes suite à un marquage au ¹⁵N de placettes après sept ans d'apports de 50 kg N ha⁻¹ an⁻¹: 55% deux jours après l'application du traceur en début de saison de végétation et 54% 3,5 mois après le marquage, en fin de saison de végétation (en excluant le compartiment nécromasse non pris en compte dans notre expérimentation et qui représente dans l'étude citée respectivement 12 puis 9 % de recouvrement de l'azote marqué).

Ces taux de recouvrements importants et stables dans le temps suggèrent une forte immobilisation de l'azote exogène par les plantes et les microorganismes du sol et/ou une forte fixation d'ammonium sur le complexe argilo-humique du sol. Nos résultats mettent en évidence qu'une grande partie de cet azote est immobilisé dans la végétation (et majoritairement dans les parties aériennes, **Figure 4.6**). Ceci peut s'expliquer par une interception et une absorption directe de l'azote par les feuilles lors de la pulvérisation. En effet, le recouvrement total de la végétation étant très proche de 100%, la majorité de l'azote apporté par pulvérisation (de même que l'azote déposé « naturellement ») entre en contact avec la végétation avant d'atteindre le sol. Les feuilles peuvent constituer une voie importante d'absorption d'azote pour la plante (Bobbink *et al.*, 1992; Fageria *et al.*, 2009; Sparks, 2009). Les études portant sur l'absorption des formes gazeuses d'azote (NO₂, NH₃) sont cependant plus nombreuses que celles concernant l'absorption des ions azotés présents dans les dépôts humides. Les connaissances actuelles des processus et capacités de pénétration foliaire des ions restent très limitées, cependant le développement

important de fertilisants foliaires en agriculture et la démonstration de leur efficacité suggèrent qu'il puisse s'agir d'une voie non négligeable d'acquisition (Fernández & Eichert, 2009; Fernández & Brown, 2013). Le prélèvement foliaire (gaz, particules ou ions dissous dans les précipitations) est rarement pris en compte en tant qu'entrée spécifique de l'azote dans l'écosystème (Sparks, 2009). Pourtant, l'azote déposé sur le sol peut être volatilisé, lessivé ou prélevé par les microorganismes avant d'atteindre les racines de la plante, quand l'azote intercepté par les feuilles peut être directement absorbé. Les proportions importantes d'azote exogène dans les parties aériennes observées lors de cette expérimentation suggèrent donc une entrée de l'azote dans les parties aériennes indépendamment du prélèvement racinaire.

En 2014, la part d'azote exogène recouvrée dans le sol a augmenté, au dépend de celle des parties aériennes (**Figure 4.6**). Ce transfert d'azote des parties aériennes vers le sol doit correspondre pour partie à la sénescence des parties aériennes qui s'accompagne de la formation d'une litière rapidement incorporée au sol. En effet, à l'exception des Ericacées, *C. vulgaris* et *Vaccinium* sp., les plantes composant la pelouse sont pérennes hémicryptophytes ou géophytes : toutes les parties aériennes sont sénescentes à l'automne et de nouvelles tiges et feuilles sont formées au printemps suivant. Une masse importante de matière organique est donc transférée au sol entre deux saisons de végétation. Cependant, une partie de l'azote est résorbée lors de la sénescence des parties aériennes, conservée dans les organes souterrains et réallouée aux parties aériennes la saison suivante. Des taux de résorption et réallocation de 50 à 70 % de l'azote contenu dans les feuilles ont été rapportés chez des plantes décidues alpines et subalpines (Jaeger & Monson, 1992; Aerts, 1996; Schäppi & Körner, 1997; Soudzilovskaia *et al.*, 2007). Ce phénomène participe au taux de recouvrement élevé de l'azote exogène dans la végétation entre 2013 et 2014. Enfin, une partie du transfert d'azote des parties aériennes vers le sol peut avoir eu lieu via un transport des parties aériennes vers les racines puis l'excrétion racinaire de NH_4^+ (Marty *et al.*, 2009) ou la sénescence de certaines racines.

L'azote exogène non retrouvé dans le système sol-plantes peut avoir été perdu par dénitrification, volatilisation et lessivage. Les pertes par volatilisation de NH_3 sont supposées très faibles en raison de la quantité limitée de NH_4^+ dans le sol et du pH acide (Bowden, 1986). Nos résultats ne permettent cependant que d'affirmer que la somme de ces flux représente moins de 40 % de l'azote reçu par pulvérisation, leur part relative en comparaison aux pertes d'ordre méthodologiques lors des pulvérisations et des prélèvements n'ayant pas été mesurée. En comparaison, les forêts de conifères considérées comme saturées en azote présentent des pertes par lessivage correspondant à entre 30 et 100 % de l'azote qu'elles reçoivent (Butterbach-Bahl *et*

al., 2011). Par ailleurs, le taux de recouvrement total en août 2014 identique à celui d'août 2013 suggère que les pertes d'azote apporté par pulvérisations ont eu lieu rapidement suite aux apports et qu'une fois immobilisé, l'azote exogène est conservé durablement dans le système. Cette hypothèse est soutenue par les résultats de Bassin et al. (2015) montrant un recouvrement de 67 % dans le système plante-nécromasse-sol deux jours seulement après l'apport d'azote marqué puis une stabilité de ce taux de recouvrement jusqu'à la fin de la saison de végétation.

c - Effet de la quantité d'azote et des serres sur ce devenir

La proportion d'azote exogène recouvrée dans le système sol-végétation est identique pour les trois doses d'azote apportées et en présence ou en absence de serres (**Figure 4.7**). Ce résultat montre la capacité potentielle de l'écosystème à accumuler l'azote d'origine atmosphérique jusqu'à un taux de $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$, soit 4 fois le taux du dépôt naturel sur ce site, sans atteindre la saturation (pas d'augmentation de la proportion d'azote perdu). Par ailleurs, ces résultats suggèrent également que le changement climatique ne modifierait pas cette capacité à accumuler l'azote provenant des dépôts atmosphériques.

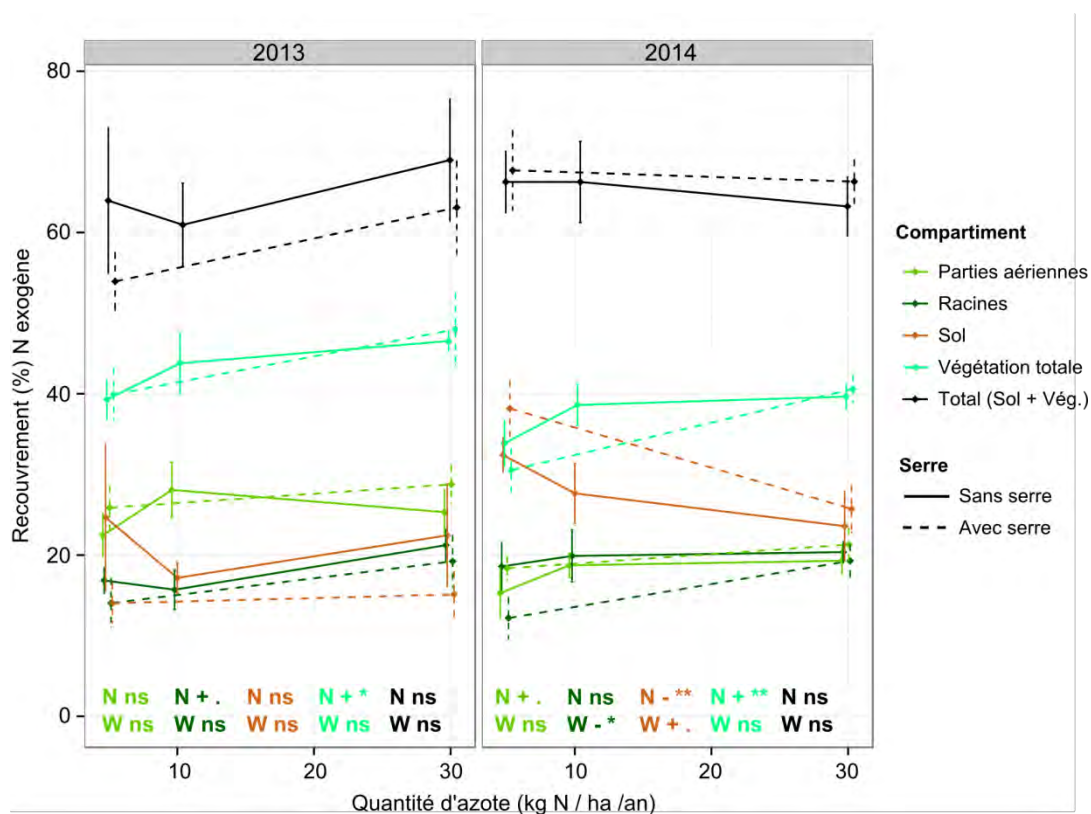


Figure 4.7. Effets des traitements quantité d'azote (N) et serre (W) sur le recouvrement de l'azote exogène dans les principaux compartiments de l'écosystème en 2013 et en 2014. La significativité de l'effet des traitements est reportée (ns : non significatif ; . : $p < 0,1$; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$) ainsi que le sens de l'effet (+ : effet positif, - : effet négatif). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Effets des apports d'azote

La quantité d'azote apporté a un effet positif significatif sur le recouvrement de l'azote exogène dans la végétation. Cet effet est visible dans les parties aériennes et dans les racines mais n'est pas, ou seulement marginalement, significatif dans chacun de ces compartiments pris individuellement. De façon opposée, la quantité d'azote apporté a un effet négatif (significatif en 2014) sur le taux de recouvrement de l'azote exogène dans le sol (**Figure 4.7**). Ce résultat pourrait s'expliquer par une augmentation de la teneur en azote de la végétation et de la biomasse. Une augmentation de biomasse et de la hauteur de la végétation ont pu accroître le potentiel d'interception de l'azote apporté par le couvert végétal. Ces résultats sont très cohérents avec ceux observés par Bassin et al. (2015) : un recouvrement de l'azote marqué plus important dans la phytomasse et moins important dans le pool d'azote stabilisé du sol dans les placettes recevant des apports d'azote par rapport aux placettes contrôle.

Effets des serres

La présence de serre a un effet négatif significatif sur le taux de recouvrement dans les racines et un effet positif marginalement significatif sur le taux de recouvrement dans le sol (**Figure 4.7**). L'activité des microorganismes du sol est généralement favorisée par des températures élevées (Schmidt *et al.*, 1999). La compétition entre racines et microorganismes pour le prélèvement de l'azote pourrait être augmentée, ce qui expliquerait l'effet négatif de l'augmentation de température sur le recouvrement de l'azote exogène dans les racines.

4.3.2. Effets des apports **d'azote** et des serres sur la végétation et le sol

a - Caractéristiques biochimiques et biomasse de la végétation

Effets de la quantité d'azote apporté

Teneur en N et C

La teneur moyenne (\pm erreur standard) en N des parties aériennes de la végétation dans les placettes contrôle est de $1,24 \pm 0,03$ % sauf chez le groupe des non-vasculaires qui présente un pourcentage inférieur ($0,84 \pm 0,09$ %) et les Fabacées aux tissus beaucoup plus riches en N ($2,21 \pm 0,39$ %). La teneur en N des racines est de $0,94 \pm 0,03$ %, soit un quart de moins que dans la canopée. La concentration en N des parties aériennes de toutes les espèces ou groupes d'espèces ainsi que dans les racines augmente avec le niveau d'azote apporté (**Figure 4.8**). Cette tendance se manifeste dès la deuxième année d'expérimentation (2013) et est visible chez

plusieurs groupes dès $5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$. L'augmentation est la plus marquée chez les plantes non vascularisées, avec environ $+ 25 \%$ à $5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ par rapport au contrôle et une teneur en N quasiment doublée à $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Chez les plantes vasculaires, en 2014 (après 3 années d'expérimentation), l'enrichissement en azote des tissus aériens est de $0,18 \%$ dans le traitement N5 et de $0,30 \%$ dans le traitement N30 (en valeur absolue), ce qui correspond pour ce dernier à une augmentation de la teneur en N supérieure à $\frac{1}{4}$ de celle des contrôles.

La concentration en C des organes aériens de la végétation est en moyenne de $43,86 \pm 0,32 \%$ dans les placettes contrôle. De façon moins prononcée et moins nette que pour l'azote mais néanmoins significative, la teneur en carbone des parties aériennes augmente en réponse aux apports d'azote chez quasiment tous les groupes (à l'exception des eudicotylédones) mais pas dans les racines (**Figure 4.8**). Cet effet est plus marqué après 3 années d'expérimentation et peut provenir d'une augmentation de l'assimilation du carbone par la photosynthèse en réponse à l'enrichissement des tissus foliaires en N (Evans, 1989; Körner, 1989). Le rapport C:N diminue systématiquement dans les parties aériennes et les racines chez tous les groupes en réponse à l'augmentation des apports d'azote (**Figure 4.8**), reflétant un enrichissement des tissus en azote plus important qu'en carbone. La composition élémentaire des racines révèle un pourcentage de C ($28,43 \pm 1,36 \%$) et un ratio C:N ($30,67 \pm 1,77$) plus faible que dans la canopée (C:N de $37,99 \pm 1,35$). Si des pourcentages de C et N plus faibles dans les racines que dans les parties aériennes ont été observés dans d'autres études, les ratios C:N y sont plus élevés dans les racines que dans les parties aériennes (Bazot *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Ces différences peuvent provenir des protocoles utilisés pour le prélèvement et la préparation des échantillons de racines (exclusion ou non des racines mortes, taux de perte des racines les plus fines, subsistance de matière minérale...). Néanmoins, si l'on compare les traitements, les tendances évoquées pour les organes aériens se retrouvent chez les racines.

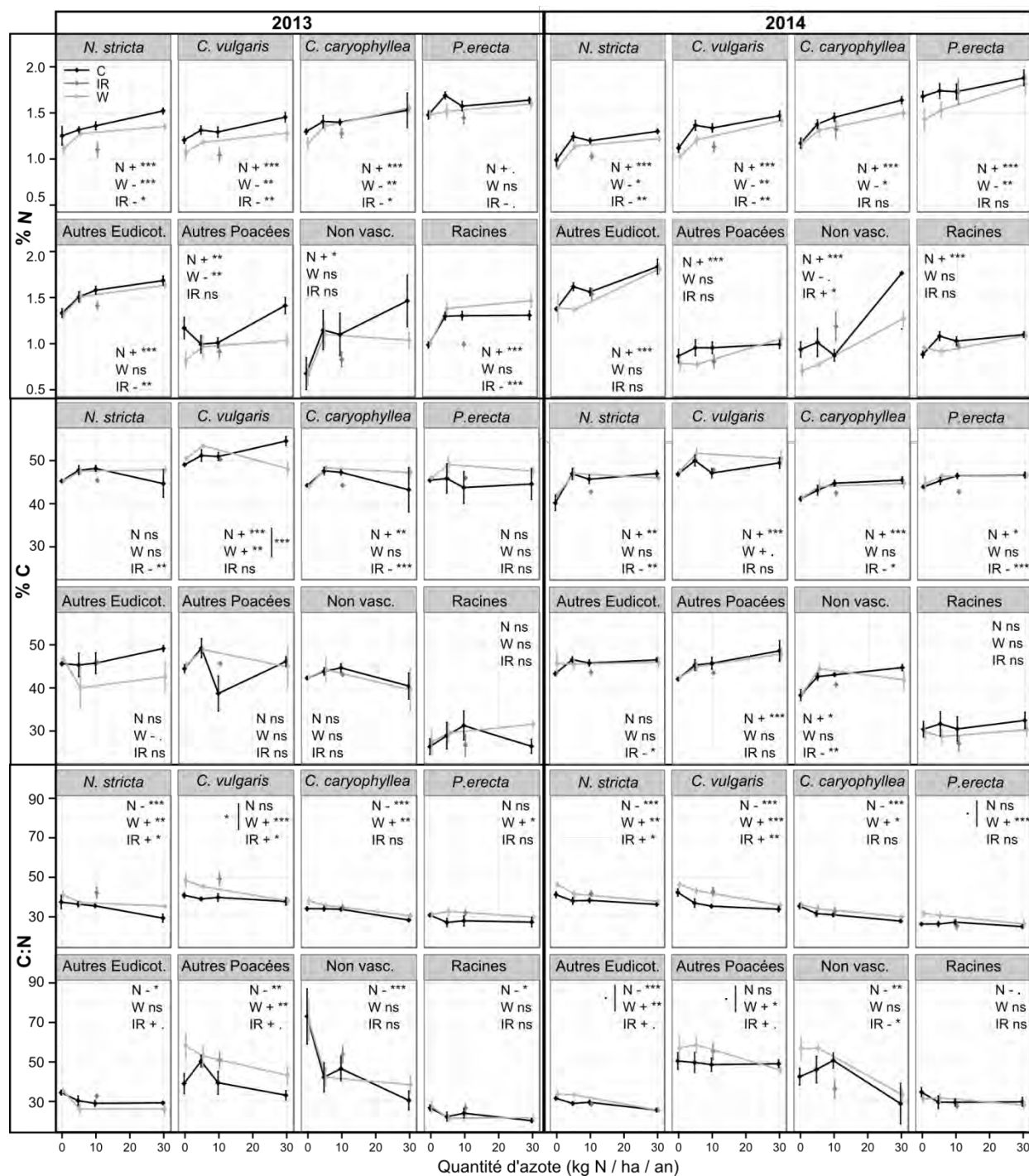


Figure 4.8. Effets des traitements quantité d'azote, serre (W) et forme de l'azote (IR) sur les teneurs en N, C et le ratio C:N de la végétation. C indique les traitements contrôles (sans serre et sans inversion du rapport des formes de l'azote). La significativité de l'effet des traitements est reportée (ns : non significatif ; . : $p < 0,1$; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$) ainsi que le sens de l'effet (+ : effet positif de la quantité d'azote, des serres ou de l'inversement du rapport azote réduit vs oxydé vers plus d'azote oxydé, - : effet négatif). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Attention, l'origine des axes des ordonnées est différente de zéro.

Biomasse

La biomasse aérienne est de $428 \pm 48 \text{ g m}^{-2}$ et celle des racines de $3340 \pm 310 \text{ g m}^{-2}$ en moyenne sur les deux années dans les placettes contrôle. Le rapport biomasse aérienne / biomasse souterraine est un indice de la contrainte endurée par la végétation dans son environnement : ce rapport diminue généralement avec l'intensité de la contrainte (Chapin *et al.*, 1987; Mokany *et al.*, 2006). Pour la pelouse subalpine, le ratio très bas (environ 1/8) que nous avons mesuré reflète donc en partie la dureté des conditions environnementales en altitude (faibles température, durée de la saison de végétation, oligotrophie, herbivorie).

La pelouse est très largement dominée par *C. vulgaris* qui représente dans les placettes contrôle en moyenne 32 % en 2013 et 44% en 2014 de la biomasse aérienne, et *N. stricta* qui représente respectivement 29 % et 32 %. Les autres espèces sont beaucoup moins représentées (Tableau 4.3).

Tableau 4.3. Biomasses mesurées en août 2013 et 2014 et fréquences d'occurrence des différentes espèces (ou groupes) dans les placettes expérimentales.

	Biomasse (g m^{-2}) placettes contrôle*		Nb d'occurrences sur toutes les placettes (48)	
	2013	2014	2013	2014
<i>C. vulgaris</i>	119 \pm 50 (6)	240 \pm 83 (6)	46	45
<i>N. stricta</i>	109 \pm 17 (6)	177 \pm 27 (6)	48	48
Autres eudicot.	24 \pm 4 (6)	33 \pm 6 (6)	47	46
<i>C. caryophylllea</i>	21 \pm 4 (6)	34 \pm 7 (6)	48	47
<i>P. erecta</i>	11 \pm 4 (6)	14 \pm 3 (6)	47	47
Autres Poacées	12 \pm 5 (3)	13 \pm 9 (6)	35	45
Non vasculaires	43 \pm 32 (4)	8 \pm 4 (6)	38	33
Fabacées	11 (2)	24 (2)	15	15
<i>Luzula sp.</i>	< 1 (1)	5 (3)	16	13
<i>Vaccinium sp.</i>	20 (1)	< 1 (1)	14	18
Autres monocot.	< 1 (1)	< 1 (1)	10	6

*Biomasse moyenne \pm erreur standard (nombre de placettes contrôles où l'espèce apparaît).

Les espèces en gris ont été exclues des modèles testant l'effet des traitements sur les différentes variables en raison de leur faible nombre d'occurrence dans les placettes.

Les apports d'azote ont modifié la composition élémentaire des tissus de tous les groupes composant la communauté (augmentation de la teneur en N notamment, **Figure 4.8**), mais seuls *C. caryophylllea* et le groupe des Poacées (*N. stricta* exclu) ont augmenté significativement leur biomasse en réponse à ces apports (**Tableau 4.4**). L'augmentation de la biomasse des Poacées en réponse à la quantité d'azote apporté est significative à $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ ($p = 0,008$) et correspond en moyenne à une augmentation entre 2012 et 2014 de 29 g m^{-2} de plus dans ce traitement par rapport au contrôle. La réponse de *C. caryophylllea* est moins claire avec une

augmentation de biomasse entre 2012 et 2014 de 4 g m^{-2} de plus dans le traitement à $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ par rapport au contrôle ($p = 0,082$) mais qui tend à être moins importante dans les traitements à 5 et $10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ que dans le contrôle. Les eudicotylédones (Fabacées, Ericacées et *P. erecta* exclues) ont également répondu de façon marginalement significative en 2014 (**Tableau 4.4**). La hauteur moyenne de la végétation a significativement augmentée en 2014 en réponse à l'apport de $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ ($p < 0,001$).

Tableau 4.4. Effets des traitements quantité d'azote, présence de serre et de leur interaction, ainsi que du traitement forme de l'azote, sur les biomasses : significativité (p) et sens de l'effet (+ : effet positif ; - : effet négatif) d'après les modèles linéaires mixtes. Le sens de l'effet de la forme de l'azote est celui de l'inversement du rapport azote réduit vs oxydé en faveur de l'azote oxydé. Les probabilités $< 0,05$ sont indiquées en gras et celles $< 0,1$ en italique.

Biomasse	Azote (quantité)		Serre		Azote (qté) x Serre		Azote (forme)	
	p	Effet	p	Effet	p		p	Effet
Biomasse racinaire 2013	0,269		0,328		0,719		0,657	
2014	0,162		0,499		0,408		0,489	
Δ Biom <i>N. stricta</i> 2013 – 2012	0,330		0,310		0,125		0,978	
2014 – 2012	0,113		0,993		0,658		0,857	
Δ Biom <i>C. vulgaris</i> 2013 – 2012	0,414		0,195		0,404		0,359	
2014 – 2012	0,924		0,438		0,442		0,236	
Δ Biom <i>C. caryophylla</i> 2013 – 2012	0,058	+	0,213		0,231		0,044	+
2014 – 2012	0,016	+	0,307		0,122		0,262	
Δ Biom <i>P. erecta</i> 2013 – 2012	0,574		0,812		0,795		0,707	
2014 – 2012	0,829		0,653		0,265		0,388	
Δ Biom autres eudicotylédones 2013 – 2012	0,443		0,074	-	0,727		0,464	
2014 – 2012	0,074	+	0,599		0,500		0,104	
Δ Biom autres Poacées 2013 – 2012	0,147		0,719		0,125		0,456	
2014 – 2012	0,021	+	0,155		0,955		0,231	
Δ Biom non vasculaires 2013 – 2012	0,232		0,638		0,572		0,961	
2014 – 2012	0,209		0,026	+	0,644		0,297	

Azote exogène des parties aériennes

L'azote provenant des apports 2012 et 2013 se retrouve en grande partie dans les organes aériens où il peut représenter une proportion conséquente de l'azote total. Cette proportion augmente avec la quantité d'azote apporté pour toutes les espèces ou groupes (**Figure 4.9**). L'étude de la proportion d'azote exogène marqué par rapport à l'azote total dans les tissus des différents groupes de plantes fournit des informations quand à leur capacité à prélever et conserver cet azote, par rapport aux autres sources d'azote dont elles disposent. Ici, la capacité à

prélever l'azote exogène dépend à la fois de la capacité à l'intercepter (surface de feuillage ou de racines, position dans la canopée...) et à l'absorber.

Le groupe des non vasculaires est le plus efficace à prélever l'azote pulvérisé, surtout lors d'apports faibles à modérés (**Figure 4.9**). En l'absence de système racinaire, de vascularisation et de cuticule, les mousses et lichens absorbent efficacement les nutriments des dépôts atmosphériques qui constituent leur principale source nutritive. Nos résultats montrent que l'azote apporté par pulvérisation en 2012-2013 est absorbé pour constituer de $8,5 \pm 0,7$ % (dans le traitement N5) à $32,3 \pm 2,0$ % (dans le traitement N30) de l'azote des tissus de ce groupe en août 2013 (**Figure 4.9**). Ils conservent également très bien les nutriments acquis comme en témoigne l'évolution quasi nulle du taux d'azote exogène entre 2013 et 2014 (**Figure 4.9**). Cette absence de turn-over rapide de l'azote chez les lichens peut s'expliquer par l'absence de renouvellement saisonnier des tissus (Nash III, 2008).

C. caryophyllea et le groupe des Poacées (*N. stricta* inclus) sont, après les mousses et lichens, les groupes les plus efficaces pour prélever l'azote apporté. L'azote exogène représente jusqu'à $37,6 \pm 2,0$ % (*C. caryophyllea*), $29,4 \pm 1,9$ % (Poacées), et $24,0 \pm 1,0$ % (*N. stricta*) de l'azote total des feuilles en 2013 et $25,6 \pm 1,2$ % (*C. caryophyllea*), $17,3 \pm 0,7$ % (Poacées), et $16,0 \pm 0,6$ % (*N. stricta*) en 2014 (traitement $30 \text{ kg ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$; **Figure 4.9**). Les autres groupes de la pelouse présentent une contribution plus faible de l'azote exogène à l'azote total : de l'ordre de 17 % pour *C. vulgaris* et *P. erecta*, 14% pour *Vaccinium* sp. et 8 % pour les Fabacées. Nos résultats mettent en évidence la stratégie développée par certaines plantes supérieures, et son efficacité, consistant à investir dans les feuilles l'azote apporté par l'atmosphère : les espèces les plus efficaces pour utiliser l'azote des apports aériens pour constituer leur pool d'azote foliaire sont aussi celles qui ont augmentée plus fortement leur biomasse en réponse à ces apports (*C. caryophyllea* et les Poacées). Plusieurs études ont d'ailleurs également cité les Cypéracées et les Poacées comme étant favorisés par les apports d'azote (Bobbink *et al.*, 2002; Soudzilovskaia *et al.*, 2005; Bowman *et al.*, 2006; Bassin *et al.*, 2007, 2013; Onipchenko *et al.*, 2012).

Le groupe des autres eudicotylédones présente un rapport $N_{\text{exo}}/N_{\text{tot}}$ proche de celui mesuré chez les Poacées (**Figure 4.9**). Pourtant, leur biomasse a moins fortement augmenté avec les apports d'azote par rapport à la réponse des Poacées (**Tableau 4.4**). Le groupe des eudicotylédones est constitué en majorité de plantes de petite taille, enfouies dans la canopée. Une co-limitation de leur productivité par la lumière pourrait expliquer une augmentation de biomasse limitée malgré un bon prélèvement de l'azote apporté. Enfin, les Fabacées retiennent peu d'azote exogène (**Figure 4.9**). Ces plantes possèdent des tissus riches en N et obtiennent une

part importante de cet azote via la fixation symbiotique de N_2 . Cette fixation étant un processus très couteux en glucides pour la plante (Silsbury, 1977; Atkins, 1984), les Fabacées seraient défavorisées face aux autres groupes par une augmentation des dépôts atmosphériques d'azote.

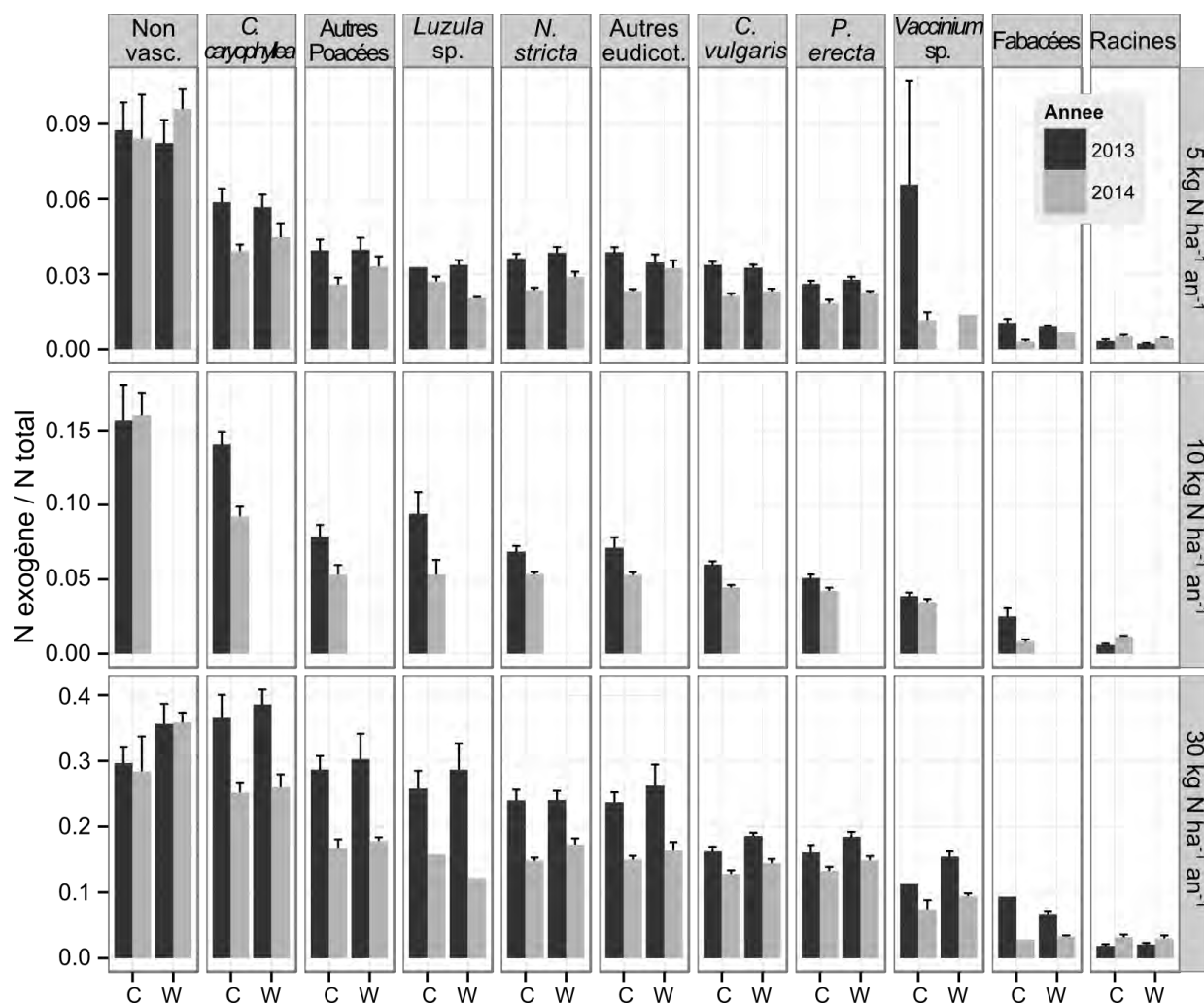


Figure 4.9. Rapport de l'azote exogène sur l'azote total dans les parties aériennes des différentes espèces ou groupes d'espèces et dans les racines (colonnes) en fonction des différents traitements : quantité d'azote (lignes) et serre (abscisse ; C = sans serre, W = avec serre). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Attention : l'axe des ordonnées n'est pas le même pour chaque traitement d'azote.

Effets de la forme de l'azote

Pour une même quantité de N apportée (10 kg ha⁻¹ an⁻¹), l'inversion de la proportion ammonium-nitrate en faveur du nitrate a un effet négatif sur la teneur en azote mais positif sur le rapport C:N chez *N. stricta* et *C. vulgaris* en 2013 et 2014 (parties aériennes). Des réponses similaires mais marginalement significatives et/ou non répétées sur les deux années ont été observées chez *C. caryophylla*, *P. erecta*, les eudicotylédones, les Poacées et dans les racines.

La teneur en carbone de *N. stricta* et *C. caryophylla* a également été significativement réduite les deux années lorsque la proportion de nitrate était augmentée (uniquement la deuxième année chez *P. erecta*, les eudicotylédones et les non vasculaires, **Figure 4.8**). La forme de l'azote apporté n'a pas eu d'effet significatif sur la biomasse aérienne ou racinaire de la végétation, à l'exception de la biomasse aérienne de *C. caryophylla* en 2013 (**Tableau 4.4**).

Nos résultats suggèrent un effet moins important du nitrate que de l'ammonium sur les parties aériennes pour un même apport en azote. L'ammonium est plus efficacement absorbé par prélèvement foliaire que le nitrate chez de nombreuses plantes (Brumme *et al.*, 1992; Peuke *et al.*, 1998; Uscola *et al.*, 2014). Et concernant le prélèvement racinaire, les espèces de la pelouse subalpine prélèvent préférentiellement l'azote sous forme d'ammonium, à 80 % chez les Ericacées et à 60% chez les Poacées (Pornon *et al.*, 2007). De plus, l'anion nitrate est très mobile dans le sol qui porte de nombreuses charges négatives indiffusibles et est donc facilement lixivié. Il est ainsi possible que le nitrate apporté reste moins longtemps que l'ammonium à disposition des racines et contribue moins à augmenter le pool d'azote minéral du sol.

Effets des serres

Dans les serres (tous traitements d'apport d'azote confondus), la hauteur moyenne de la végétation a significativement augmenté (modèle linéaire mixte, $p = 0,017$) en 2014. L'augmentation de la hauteur moyenne correspond probablement principalement à une augmentation de la hauteur des Poacées et de *C. vulgaris* (plantes généralement les plus hautes dans cette pelouse). En revanche, les serres n'ont pas eu d'effet significatif sur la biomasse aérienne et racinaire, à l'exception des non vasculaires en 2014 (**Tableau 4.4**). Les serres ont eu un effet négatif sur la teneur en azote et un effet positif sur le rapport C:N des parties aériennes de tous les groupes à l'exception des autres eudicotylédones (% N) et des non vasculaires (C:N). Ces effets sont plus ou moins marqués selon les groupes et l'année (**Figure 4.8**). Aucun effet clair sur la teneur en carbone des parties aériennes ou sur les teneurs en azote et carbone des racines n'a en revanche été observé (**Figure 4.8**).

Wahren *et al.* (2013) ont également observé une augmentation de la hauteur de la canopée en réponse au réchauffement dans une lande alpine. Hobbie *et al.* (1999) et Weih and Karlsson (2001) rapportent une accélération de la croissance des parties aériennes et une diminution de la teneur en azote des tissus des plantes en réponse à une augmentation de la température de l'air sur des espèces adaptées aux milieux froids. Par ailleurs, plusieurs études ont révélé une augmentation de la teneur en azote dans les plantes alpines avec l'altitude (Körner, 1989, 1999).

L'origine de cette relation reste discutée. Il pourrait s'agir d'une limitation de la croissance par la température entraînant mécaniquement une élévation de la concentration de N dans les tissus (Körner & Larcher, 1988) ou d'une adaptation physiologique aux environnements froids (Weih & Karlsson, 1999, 2001). La tendance générale pour la majorité des groupes est une diminution de la teneur en N sans augmentation marquée de la biomasse en réponse à la présence de serre. Cependant, un effet favorable des serres sur la croissance peut ne pas avoir été détecté par les analyses de biomasse. En effet, l'analyse repose sur l'accroissement de biomasse entre le début de l'expérimentation (estimation par modélisation) et le prélèvement final (mesure réelle), ce qui est moins précis que l'analyse directe des teneurs en N. De plus, la variabilité de biomasse inter-placettes des différents groupes est plus importante que celle des teneurs en N.

Par ailleurs, la concentration en CO₂ de l'air dans les serres n'a pas été mesurée. Nous ne pouvons donc pas écarter la possibilité d'un effet positif des serres sur cette concentration, même si plusieurs observations sur des dispositifs comparables ont rapporté peu ou pas d'effet sur la concentration en CO₂ (Marion *et al.*, 1997). Une augmentation de la concentration en CO₂ de l'air favorise généralement l'assimilation du carbone par la photosynthèse (Norby & O' Neill, 1991; Teskey, 1995, 1997). Ainsi, il n'est pas exclu que l'augmentation de hauteur de la végétation et la dilution de l'azote dans les tissus en présence de serre soient également dues à une augmentation de la concentration en CO₂ de l'air. L'augmentation de la concentration en CO₂ est cependant une composante du changement global étroitement liée aux changements climatiques.

Interactions apports d'azote et serres

La quantité d'azote apportée a eu un effet positif sur la biomasse de certains groupes et les serres sur la hauteur de la végétation. En revanche, les deux traitements ont des effets opposés sur la teneur en azote et le rapport C:N dans les parties aériennes, l'azote apporté augmentant la teneur en azote des tissus quand les serres la réduise. Chez de nombreux groupes et plus fortement en 2014, l'effet négatif des serres sur la teneur en azote n'annule pas l'effet positif des apports : la teneur en azote apparaît plus élevée dans la végétation des placettes avec apports et serres que des placettes contrôles (**Figure 4.8**). En revanche, très peu d'interactions entre les effets des apports d'azote et des serres ont été observées, et aucun n'est confirmé sur les deux années d'observation (**Tableau 4.4** et **Figure 4.8**).

Les études expérimentales ayant combiné des apports d'azote et des modifications du climat dans des milieux différents rapportent essentiellement des effets indépendants (additifs ou

compensatoires) sur la diversité végétale (Zavaleta *et al.*, 2003), la biomasse aérienne (Hutchison & Henry, 2010) et la phénologie des plantes (Xia & Wan, 2013).

b - Composition et structure de la communauté végétale

Les deux premiers axes de l'analyse de co-correspondance sur les placettes t1 expliquent respectivement 43,7% et 22,8% de la variance totale et ceux de l'analyse sur les placettes t2, 34,3% et 23,4%. Les deux analyses révèlent la stabilité de la composition spécifique sur ces 3 premières années d'expérimentation. En effet, aucune différence significative (au seuil de 5%) n'est détectée dans les coordonnées des placettes sur les axes des analyses entre le début de l'expérimentation (2012) et leur prélèvement (2013 ou 2014), quelque-soit la combinaison de traitements (**Tableau 4.5**).

Tableau 4.5. Différences entre les coordonnées sur les axes 1 et 2 des analyses de co-correspondance pour les placettes t1 (entre 2012 et 2013) et les placettes t2 (entre 2012 et 2014) et leur significativité (p) d'après les tests de Mann-Whitney-Wilcoxon. Les p-valeurs < 0,1 sont reportées en italique.

Traitements	t1 : 2013 - 2012				t2 : 2014 - 2012			
	Axe 1		Axe 2		Axe 1		Axe 2	
	Différence	p	Différence	p	Différence	p	Différence	p
N0 C	-0,0074	0,844	0,0759	0,438	-0,0245	0,563	0,0230	0,438
N0 W	-0,0245	0,688	0,2531	<i>0,094</i>	0,0093	0,844	0,0147	1
N5 C	-0,0084	0,844	-0,3430	0,219	0,0160	0,563	-0,0341	0,313
N5 W	0,0395	0,156	-0,0058	1	-0,0165	0,688	0,0307	0,563
N10 C	-0,0481	<i>0,094</i>	0,1179	0,563	-0,0484	0,313	-0,0192	0,563
N10 IR	0,0514	0,156	0,1209	<i>0,094</i>	0,0267	0,563	-0,0057	0,688
N30 C	-0,0398	0,313	-0,0400	0,844	0,0582	0,563	0,0509	0,156
N30 W	-0,0188	0,688	-0,2100	0,563	0,0761	0,438	0,0361	0,563

L'indice de Shannon a eu tendance à globalement augmenter au cours de l'expérimentation, sauf dans le cas du traitement 10 kg N ha⁻¹ an⁻¹ avec le rapport inversé en faveur du nitrate entre 2012 et 2013. Cette augmentation observée même sur les placettes contrôle peut s'expliquer par un changement dans le recouvrement des espèces en réponse aux variations climatiques interannuelles et/ou à l'exclusion du pâturage du site. La quantité d'azote apportée a un effet positif marginalement significatif (p = 0,065) sur la différence d'indice de Shannon entre 2012 et 2014 (**Figure 4.10**). La richesse spécifique n'ayant pas répondu significativement aux traitements (p = 0,681 pour les placettes t₁ ; p = 0,409 pour les placettes t₂), l'augmentation de la diversité de Shannon en réponse aux apports d'azote reflète donc plutôt

des changements dans les recouvrements des espèces vers une plus grande équitabilité ($p = 0,126$ pour les placettes t_1 , $p = 0,009$ pour les placettes t_2).

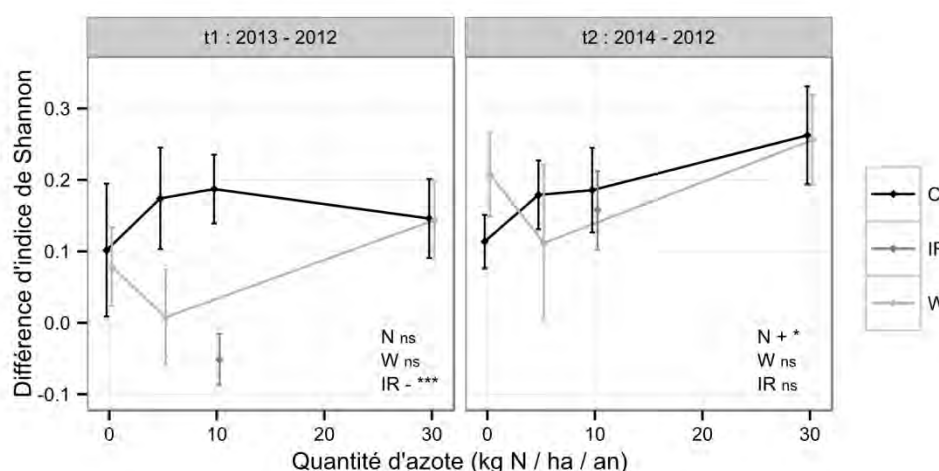


Figure 4.10. Effets des traitements quantité d'azote, serre (W) et forme de l'azote (IR) sur l'indice de Shannon entre 2012 et 2013 (placettes t_1) ou entre 2012 et 2014 (placettes t_2). Une différence positive indique une augmentation de l'indice et inversement. C indique les traitements contrôles (sans serre et sans inversion du rapport des formes de l'azote). La significativité de l'effet des traitements est reportée (ns : non significatif ; . : $p < 0,1$; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$) ainsi que le sens de l'effet quand approprié (+ : effet positif de la quantité d'azote, du réchauffement ou de l'inversement du rapport azote réduit vs oxydé vers plus d'azote oxydé, - : effet négatif). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Après 3 ans d'expérimentation, le recouvrement des espèces dominantes (*N. stricta* et *C. vulgaris*) a été très peu impacté par la quantité d'azote alors que le recouvrement d'autres groupes, tels que *C. caryophylla*, les autres eudicotylédones et autres Poacées, a augmenté (**Tableau 4.6**). Les autres eudicotylédones et les autres Poacées ont respectivement augmenté leur recouvrement entre 2012 et 2014 de 22 % ($p < 0,001$) et 12 % ($p = 0,001$) de plus (en valeur absolue) dans le traitement à $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ par rapport au contrôle. Seuls les recouvrements de *P. erecta* (2013) et *C. vulgaris* (2014) ont marginalement diminué en réponse à la quantité d'azote (**Tableau 4.6**). Les espèces ou groupes ayant répondu aux apports d'azote par une augmentation du recouvrement sont ceux ayant démontré une augmentation de biomasse et/ou une contribution importante de l'azote provenant des apports à l'azote total de leurs tissus : autres Poacées, *C. caryophylla* et autres eudicotylédones. Une augmentation du recouvrement de quelques espèces sans diminution concomitante de l'abondance d'autres espèces, conduisant ainsi à une augmentation de la diversité via une augmentation de l'équitabilité, a également été observée dans des pelouses alpines sèches après 4 ans d'apports à $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (Colorado, USA ; Bowman et al., 2006).

En 2013, l'inversion du ratio des formes de l'azote en faveur du nitrate a eu un effet négatif significatif sur la diversité ($p < 0,001$) et l'équitabilité ($p = 0,037$), via un effet négatif sur le recouvrement des eudicotylédones et autres Poacées (**Tableau 4.6**). Cet effet n'est cependant plus observé en 2014 et la forme de l'azote n'a pas eu d'effet sur la biomasse de ces groupes (**Tableau 4.4**). Les serres ont eu peu d'effets (et non répétés sur les deux années) sur le recouvrement des espèces ou groupes d'espèces (**Tableau 4.6**), et aucun effet sur la diversité de la communauté (**Figure 4.10**).

Tableau 4.6. Effets des traitements quantité d'azote, présence de serre et de leur interaction, ainsi que du traitement forme de l'azote, sur le recouvrement des espèces ou groupes: significativité (p) et sens de l'effet (+ : effet positif ; - : effet négatif) d'après les modèles linéaires mixtes. Le sens de l'effet de la forme de l'azote est celui de l'inversement du rapport azote réduit vs oxydé en faveur de l'azote oxydé. Les probabilités $< 0,05$ sont indiquées en gras et celles $< 0,1$ en italique.

Δ Recouvrements par groupes et années	Azote (quantité)		Serre		Azote (qté) x Serre	Azote (forme)	
	p	Effet	p	Effet	p	p	Effet
<i>N. stricta</i> 2013 – 2012	0,301		0,671		0,937	0,571	
2014 – 2012	0,982		0,788		0,960	0,141	
<i>C. vulgaris</i> 2013 – 2012	0,706		0,698		0,612	0,699	
2014 – 2012	0,075	-	0,916		0,606	0,111	
<i>C. caryophylla</i> 2013 – 2012	0,251		0,058	-	0,381	0,461	
2014 – 2012	0,047	+	0,516		0,977	0,455	
<i>P. erecta</i> 2013 – 2012	0,055	-	0,069	-	0,011	0,505	
2014 – 2012	0,210		0,517		0,210	0,060	-
Autres eudicotylédones 2013 – 2012	0,080	+	0,201		0,279	0,046	-
2014 – 2012	< 0,001	+	0,937		0,633	0,423	
Autres Poacées 2013 – 2012	0,806		0,229		0,513	0,019	-
2014 – 2012	< 0,001	+	0,362		0,068	0,731	
Non vasculaires 2013 – 2012	0,877		0,199		0,579	0,294	
2014 – 2012	0,222		0,668		0,344	0,945	

c - Caractéristiques biochimiques du sol

Le sol de l'horizon racinaire (0-15 cm) de la pelouse est très acide (pH_{eau} de $4,6 \pm 0,2$ et pH_{KCl} de $3,5 \pm 0,1$), riche en matière organique ($0,52 \pm 0,02$ % de N et $8,42 \pm 0,40$ % de C) et pauvre en azote minéral ($12,5 \pm 0,8$ mg N-NH_4^+ kg^{-1} et 0 mg N-NO_3^- kg^{-1} de sol sec). L'absence de nitrate début- / mi-août peut refléter à la fois un faible taux de nitrification en raison du pH acide du sol, une faible rétention de cet ion dans les 15 premiers centimètres (lixiviation) et/ou un prélèvement efficace par la végétation en croissance.

Effets des apports d'azote

L'azote apporté n'a eu aucun effet sur la teneur en azote et en carbone du sol en 2013 et un effet positif marginalement significatif sur la teneur en azote du sol en 2014 (**Tableau 4.7**). Ce compartiment représente un pool important d'azote (essentiellement sous forme organique, $32 \pm 3 \text{ g m}^{-2}$) en comparaison des quantités apportées (de 0,5 à 3 g m^{-2} sur une année). Ainsi, l'azote appliqué sur la végétation et retrouvé dans le sol ne représente que de 0,1 à 0,4% environ de l'azote total de ce compartiment. Ceci peut expliquer le faible effet des apports sur la teneur en azote total du sol. L'azote apporté a un effet positif marginalement significatif sur la teneur en ammonium (**Tableau 4.7**) : le traitement $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ après plus de 2 ans d'apports a conduit à une augmentation d'environ 20 % par rapport au contrôle ($p < 0,001$). Cet ammonium peut provenir directement des apports et correspondre à la part non prélevée par la végétation et les microorganismes, mais également d'un efflux via les racines de certaines plantes sensibles à de trop fortes concentrations en NH_4^+ (Marty *et al.*, 2009).

La quantité et la forme de l'azote apporté ont un effet significatif, bien que de faible amplitude, sur le pH_{eau} des 15 premiers centimètres de sol en 2014 (**Tableau 4.7**). Le pH est réduit de 0,07 à 0,08 en moyenne à partir de $10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ et est plus faible de 0,1 point en moyenne dans le traitement avec une proportion d'ammonium supérieure à celle du nitrate. L'ammonium peut contribuer à l'acidification du sol via les processus de nitrification et de prélèvement racinaire qui libèrent des protons (H^+) dans le sol (Marschner *et al.*, 1991). L'absorption directe par les feuilles et l'immobilisation rapide et durable de la majeure partie des apports par les plantes et les microorganismes contribue probablement largement à la limitation de l'acidification du sol, malgré son faible pouvoir tampon.

La forme de l'azote a un effet significatif sur la teneur en C et le rapport C:N du sol en 2014: ils sont moins élevés dans le traitement apportant plus de nitrate que d'ammonium (**Tableau 4.7**). Ce résultat est cohérent avec la réduction de la teneur en C des tissus de plusieurs espèces ou groupes d'espèces dans ce traitement (**Figure 4.8**) : la litière issue de ces tissus est rapidement dégradée et compose donc, une ou deux années plus tard, une partie de la matière organique des premiers centimètres de sol.

Effet des serres

La présence d'une serre induit un effet significatif négatif, mais de faible amplitude, sur le pH_{eau} en 2013 (- 0,03 point) et le pH_{KCl} en 2014 (- 0,04 point), et positif sur la teneur en ammonium en 2013 (+ $1,66 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ de sol ; **Tableau 4.7**). Un réchauffement de la

surface du sol pourrait augmenter le taux de minéralisation de la matière organique et donc la libération d'ammonium (Kirschbaum, 1995; Rustad *et al.*, 2001), suivie de son prélèvement par les racines ou de sa nitrification, augmentant ainsi également la libération de protons dans le sol. Si nos mesures n'ont pas permis de mettre en évidence un effet des serres sur la température du sol, elles n'excluent pas non plus la possibilité d'un réchauffement des premiers centimètres du sol. Par ailleurs, l'absence de certains de ces effets en 2014 peut provenir d'un effet de réchauffement moins marqué des serres cette année là. En effet, sur ce site, l'été 2014 a été moins chaud que l'été 2013 (**Figure 4.2**) et moins ensoleillé (rayonnement global cumulé sur la période Juin-Juillet de 134 kJ cm^{-2} en 2013 contre 100 kJ cm^{-2} en 2014; d'après les données quotidiennes Météo-France). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que réchauffement climatique et dépôts azotés pourraient avoir des effets additifs sur la quantité d'ammonium et l'acidification de ces sols. L'interaction significative entre effet des apports d'azote et des serres sur la concentration en NH_4^+ du sol en 2014 correspond d'ailleurs au fait que la différence entre traitements $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ et contrôle était plus marquée en présence de serre.

Tableau 4.7. Effets des traitements quantité d'azote, présence de serre et de leur interaction, ainsi que du traitement forme de l'azote, sur les caractéristiques biochimiques du sol: significativité (p) et sens de l'effet (+ : effet positif ; - : effet négatif) d'après les modèles linéaires mixtes. Le sens de l'effet de la forme de l'azote est celui de l'inversement du rapport azote réduit vs oxydé en faveur de l'azote oxydé. Les probabilités $< 0,05$ sont indiquées en gras et celles $< 0,1$ en italique.

Caractéristiques biochimiques du sol	Azote (quantité)		Serre		Azote (qté) x Serre	Azote (forme)	
	P	Effet	P	Effet	P	P	Effet
% C sol 2013	0,137		0,080	+	0,475	0,495	
% C sol 2014	0,781		0,567		0,986	0,021	-
% N sol 2013	0,372		0,129		0,291	0,831	
% N sol 2014	0,098	+	0,553		0,733	0,137	
C:N sol 2013	0,133		0,258		0,597	0,085	+
C:N sol 2014	0,266		0,800		0,635	0,047	-
pH _{eau} sol 2013	0,971		0,015	-	0,515	0,105	
pH _{eau} sol 2014	<0.001	-	0,421		0,493	<0.001	+
pH _{KCl} sol 2013	0,682		0,466		0,927	0,888	
pH _{KCl} sol 2014	0,018	-	0,049	-	0,078	0,125	
NH ₄ ⁺ 2013 (mg/kg de sol sec)	0,207		0,017	+	0,468	0,521	
NH ₄ ⁺ 2014 (mg/kg de sol sec)	0,073	+	0,518		0,037	0,539	

4.4. Conclusion

La pelouse subalpine étudiée présente les caractéristiques d'un écosystème non saturé en azote. L'azote réactif provenant de l'atmosphère (ici des pulvérisations) est efficacement piégé et conservé dans le système végétation - sol, même dans le cas d'apports plutôt élevés pour ces milieux ($30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$). Ce résultat s'explique par (i) une forte interception et un prélèvement efficace de la végétation, que ce soit via la canopée et le prélèvement foliaire ou via le réseau dense de racines et (ii) un cycle de l'azote très conservateur, avec un fort recyclage interne dans la végétation d'une année sur l'autre et une longue persistance de la matière organique morte dans le sol. En conséquence, on peut s'attendre à ce que les dépôts azotés conduisent dans les nardaies subalpines à des modifications de la végétation (d'abord à l'échelle de l'individu puis à celle de la communauté) avant de conduire à des modifications de fonctionnement du sol et à une augmentation des exports par lessivage (Bowman *et al.*, 2006). Le devenir de l'azote déposé durant la période hivernale n'a pas été étudié dans cette expérimentation. Durant la période hivernale, le prélèvement d'azote par la végétation et les microorganismes est très réduit en comparaison avec l'activité durant la saison de végétation. Cependant, une part importante de l'azote déposé avec le manteau neigeux est libérée au moment de la fonte printanière de ce manteau. Plusieurs études ont montré que plantes et microorganismes étaient capables à ce moment là d'immobiliser une part importante de cet azote, limitant les pertes par lessivage (Brooks *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1996; Bilbrough *et al.*, 2000; Onipchenko *et al.*, 2009). Aussi, si on peut s'attendre à ce que les pertes par lessivage représentent une proportion bien plus importante de l'azote déposé durant la période hivernale par rapport à la période estivale, il est néanmoins probable que ces pertes restent limitées en comparaison à d'autres écosystèmes.

Les apports d'azote ont conduit de façon générale à un enrichissement en azote des tissus végétaux aériens et souterrains, visible dès $5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ d'apports. Seules certaines espèces ont répondu à cet enrichissement par une augmentation de leur biomasse. Il s'agit des Poacées, de certaines eudicotylédones et de *C. caryophyllea* (Cypéracée). Ces espèces apparaissent comme les plus efficaces à prélever l'azote des apports et à l'utiliser. Après seulement 3 ans d'expérimentation, il n'y a pas eu de changement majeur de composition ni de richesse spécifique dans cette communauté. En revanche, l'augmentation du recouvrement de certaines espèces (Poacées autres que *N. stricta*, certaines eudicotylédones et *C. caryophyllea*) par rapport au recouvrement des espèces dominantes a conduit à une augmentation significative de l'équitabilité de la communauté. Les apports d'azote ^{ont} eu des effets relativement faibles sur le sol, conduisant

à une légère augmentation du pool d'azote ammoniacal et une réduction du pH de faible amplitude.

Ces effets, à la fois sur la végétation et le sol, sont apparus plus marqués en réponse aux apports dominés par l'ammonium que lorsque le ratio entre les formes était inversé en faveur du nitrate. Cependant, l'effet de la forme de l'azote sur le taux de recouvrement de l'azote apporté n'a pas été testé dans cette expérimentation. L'ammonium étant a priori plus prélevé par la végétation et mieux retenu dans le sol, il est possible que des dépôts dominés par le nitrate soient moins retenus par ces milieux (Turner & Henry, 2009) et y causent donc moins de changements.

La modification du climat par l'ajout de serres n'a pas altéré la capacité de l'écosystème à retenir l'azote apporté. Le faible nombre d'interactions observées entre apports et serres suggère que le changement climatique impacte peu les réponses de la végétation et du sol aux dépôts atmosphériques azotés. En revanche, des effets additifs (sur la biomasse aérienne / hauteur de la végétation, l'azote ammoniacal dans le sol) ou compensatoires (sur la teneur en azote des tissus végétaux) ont été mis en évidence.

4.5. Perspectives de recherche

Des prélèvements de sol pour analyse des profils métaboliques des communautés bactériennes dans les différents traitements ont été réalisés par les partenaires du projet ANEMONE (cf Avant-Propos) à l'IPE-CSIC (Jaca, Espagne) sur le site expérimental du plateau de Beille. Les résultats préliminaires suggèrent un effet de la combinaison des apports d'azote à $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ et de la présence de serres sur ces profils métaboliques lors de la deuxième année d'expérimentation mais l'analyse détaillée de ces résultats est toujours en cours. Cependant, d'autres études ont également mis en évidence des changements qualitatifs et/ou quantitatifs dans la composition et l'activité des communautés de microorganismes du sol en réponse à des apports d'azote (Johnson *et al.*, 1998; Nemergut *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2013). Une quantité importante de l'azote exogène étant stockée dans la matière organique du sol, il est important de connaître la réponse des communautés microbiennes des pelouses subalpines aux changements globaux car elle est déterminante pour expliquer le devenir de cet azote exogène à long-terme.

Une modélisation de la charge critique théorique selon le modèle SMB (Simple Mass Balance model; Posch *et al.*, 2004) a été réalisée à partir des données fournies par cette expérimentation et avec les partenaires du projet ANEMONE au laboratoire ECOLAB (Toulouse, France). Des plaques lysimétriques installées sous certaines placettes du site ont

permis de mesurer les flux de lessivage (hors période hivernale). La charge critique théorique obtenue par la modélisation SMB est de $18 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Cette valeur est cohérente avec la mise en évidence d'effets des apports d'azote après 3 ans sur certains paramètres du sol à partir d'apports de $10 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (pH) ou $30 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (teneur en NH_4^+) puisqu'elle est basée sur l'équilibre des flux au sein des sols. Cependant, les observations ont également souligné la présence d'effets sur la végétation dès $5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (augmentation de la teneur en azote), valeurs cohérentes avec la charge critique empirique de $5\text{-}10 \text{ kg ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ qui est basée sur des effets observés sur la végétation (Bobbink *et al.*, 2010). La définition d'une charge critique dépend donc très fortement du compartiment (végétation, sol...) et du type de paramètre (biochimique, physiologique, communauté...) considéré. L'estimation des flux lessivés montre que le lessivage de l'azote n'augmente pas malgré la quantité d'azote apporté jusqu'à $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Ce résultat est cohérent avec celui de l'expérience de traçage isotopique de l'azote des apports ayant montré que le pourcentage de l'azote apporté recouvré dans l'écosystème (végétation + sol) est le même quelque soit le niveau d'apport. Ces résultats suggérant une accumulation de l'azote et l'apparition potentielle d'effets à long-terme révèlent l'intérêt de la nouvelle voie de modélisation des charges critiques utilisant les modèles couplés dynamique de réponse géochimique du sol et en cascade de la végétation sur le long terme (Probst & Leguëdois, 2008; Sverdrup *et al.*, 2007). Ces modèles permettent de prendre en compte des indicateurs ayant une plus grande sensibilité (changement de biodiversité) et sont basés sur des mécanismes. De plus, ils permettent l'application de scénarios de dépôts azotés couplés à des scénarios de changement climatiques (Belyazid *et al.*, 2011; Gaudio *et al.*, 2015). Cependant, les modules de fonctionnement des sols et de la végétation adaptés aux écosystèmes prairiaux ne sont pas encore développés.

Enfin, les placettes n'ayant pas encore subi de prélèvement (placettes t_x) ont été marquées au ^{15}N en 2014 et continueront à recevoir les traitements apports d'azote et serres sur plusieurs années dans la mesure du possible. Ainsi, elles devraient pouvoir apporter des informations complémentaires sur le devenir de l'azote exogène à plus long terme dans ces pelouses subalpines et dans un contexte de perdurance des dépôts azotés et des changements climatiques. Par ailleurs, suite à des mesures préliminaires d'émissions de gaz à effet de serre (CO_2 , N_2O , CH_4) sur le site en 2013 par le laboratoire ECOFUN (Lleida, Espagne), il est envisagé de réaliser des mesures plus complètes concernant ces émissions.

Chapitre 5

Conclusion générale et perspectives

5.1. Dépôts azotés dans les Pyrénées

Les mesures réalisées sur huit sites durant une année ont révélé des dépôts azotés compris entre 8 et 15 kg N ha⁻¹ an⁻¹ à l'étage subalpin dans les Pyrénées. Ces quantités sont relativement faibles en comparaison de celles relevées dans d'autres régions de France et d'Europe. Elles sont de l'ordre de, ou excèdent, la charge critique pour les pelouses subalpines, actuellement estimée à 5 – 10 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Bobbink *et al.*, 2010).

Mesurer les dépôts azotés à l'échelle des Pyrénées serait très couteux. Dans notre étude, le nombre de sites est de huit et la couverture géographique ne couvre qu'une partie de la chaîne Pyrénéenne. Les protocoles performants développés dans les réseaux de mesures Européens tels que le réseau EMEP/CCC ne sont pas transférables aux sites isolés en région montagneuse. Cela explique l'absence de stations de mesure des dépôts azotés rattachés à ces réseaux dans ces régions. Nous avons développé un protocole adapté aux contraintes de cette zone d'étude sur la base de l'utilisation d'échantillonneurs passifs pour les concentrations de gaz et de résines échangeuses d'ions pour les dépôts. Nos travaux confirment l'intérêt des résines échangeuses d'ions sur ces terrains, bien que leur préparation, extraction et analyse en laboratoire demande plus de travail et soit plus complexe que l'analyse directe des précipitations (Fenn & Poth, 2004). Enfin, la mesure des dépôts azotés dans la neige reste particulièrement difficile. Le dispositif utilisé ici fournit des estimations cohérentes mais révèle une très forte variabilité intra-site. L'installation d'un plus grand nombre de dispositifs par site est donc recommandée mais suppose un lourd travail de préparation puis d'extraction des résines. La comparaison de nos résultats aux estimations fournies par les modèles de chimie-transport EMEP et CHIMERE a révélé des dépôts mesurés supérieurs à ceux modélisés. En effet, les modèles ne sont pas spécifiques des régions montagneuses et n'ont pas vocation à y fournir une estimation précise des dépôts azotés. La météorologie et les précipitations sous formes de brouillard et de neige sont en effet particulièrement difficiles à modéliser, et ce d'autant plus en contexte de montagne. De plus, le manque d'observations dans ces régions est un frein à l'ajustement de ces modèles.

La biosurveillance apparaît comme une solution d'intérêt. Cependant, rendre compte de la variabilité spatiale des dépôts azotés à l'échelle des Pyrénées suppose de pouvoir différencier des dépôts appartenant à une fourchette étroite de dépôts faibles comparé aux régions urbanisées ou d'agriculture intensive, ou aux échelles nationale ou continentale. Les résultats de notre expérimentation sur le plateau de Beille montrent que les lichens sont particulièrement efficaces pour absorber et retenir l'azote des apports atmosphériques (**Figure 4.9**). Ceci confirme la

pertinence de leur choix comme organismes pour la biosurveillance. Cependant, l'absence de relation forte et univoque entre les teneurs en azote et en carbone de plusieurs espèces de lichens et les dépôts azotés ne permet pas actuellement la mise en place d'une méthode de biosurveillance des dépôts azotés dans les Pyrénées. En revanche, nos résultats suggèrent que les lichens foliacés saxicoles, tels que *Parmelia saxatilis*, sont plus prometteurs que les lichens terricoles (tels que les *Cladonia*) pour les milieux ouverts. La plupart des lichens saxicoles étant substrat-spécifique, il serait intéressant de trouver une espèce complémentaire de *Parmelia saxatilis* (présent sur roches siliceuses) pour les zones à affleurements calcaires. Ces lichens ne permettent pas d'estimer les dépôts dans la neige. Nous avons observé une forte variabilité intra-site et intra-spécifique des teneurs en azote et en carbone dans les lichens. Il apparaît donc essentiel de prélever un nombre important d'échantillons par site afin d'obtenir des valeurs représentatives. Sur les huit sites Pyrénéens, la teneur en carbone des lichens pourrait être négativement liée aux dépôts azotés, et notamment à l'azote réduit. La teneur en carbone est rarement mise en relation avec les dépôts azotés. La relation est plus généralement établie avec le rapport C:N. Ceci ne nous permet pas de comparer nos résultats aux observations d'autres études. Sur le site expérimental du plateau de Beille, nos résultats montrent à l'inverse une tendance à l'augmentation de la teneur en carbone avec les apports d'azote dans les tissus de quelques groupes (dont celui des non vasculaires en 2014 ; **Figure 4.8**). Ce groupe sur le site de Beille inclut des lichens terricoles (*Cladonia* sp., *Cetraria* sp., *Peltigera* sp.,...) mais également des bryophytes, ce qui pourrait expliquer en partie une différence de réponse aux apports d'azote. Néanmoins, les relations entre dépôts azotés et concentration en carbone des thalles de lichens semblent complexes et trop mal connues pour être utilisées à des fins de biosurveillance. Il serait cependant intéressant que ces relations soient davantage prises en compte et que ce paramètre soit plus souvent étudié.

5.2. Impacts sur les pelouses subalpines

5.2.1. Cohérence des effets observés à court et moyen terme

Les deux approches, expérimentale (réponse à court terme) et empirique (réponse à moyen terme), se rejoignent sur plusieurs points qui semblent caractériser la réponse des pelouses subalpines Pyrénéennes aux dépôts azotés (**Figure 5.1**).

	Court terme (2 – 3 ans)	Moyen terme (30 – 60 ans)
Communauté végétale	<p>↗ % N et ↘ C:N des tissus</p> <p>↗ recouvrement, biomasse et hauteur de certaines espèces (pas nécessairement les dominantes, plutôt parmi les Poacées, les Cypéracées et les dicotylédones herbacées non Fabacées)</p> <p>↗ équitabilité</p>	<p>Installation de nouvelles espèces (moins oligotrophes et moins adaptées aux faibles températures) >> perte d'espèces</p> <p>↓</p> <p>Changement de la composition floristique et</p> <p>↗ richesse spécifique des plantes vasculaires</p>
Sol	<p>↗ N (surtout immobilisé)</p> <p>↘ limitée du pH</p> <p>Pas d' ↗ des pertes d'N</p>	<p>↗ N } (d'après les indices → pH } écologiques des communautés végétales)</p>

Figure 5.1. Principaux changements dans la communauté végétale et le sol des pelouses subalpines Pyrénéennes en réponse à l'augmentation des dépôts azotés et au changement climatique. Résultats de l'approche expérimentale (court terme) et de l'approche empirique basée sur les relevés historiques (moyen terme).

Les réponses de la végétation apparaissent plus importantes que celles du sol. Le sol est un compartiment complexe à appréhender qui contient des sous-compartiments très différents et difficiles à étudier séparément (sol proprement dit *vs* racines et notamment les plus fines, matière minérale *vs* matière organique, matière organique vivante *vs* matière organique morte, biomasse microbienne,...). De plus, les paramètres biochimiques du sol sont spatialement très hétérogènes et variables dans le temps (concentrations des éléments, activités microbiennes, échanges sol-racines,... ; Bowman et al., 2006). Enfin, l'absence de mesures sur le sol dans les relevés historiques limite fortement la détection des changements ayant pu avoir lieu à moyen terme dans ce compartiment. Il n'est pas exclu que certains paramètres biochimiques du sol aient répondu à court ou moyen terme aux dépôts d'azote sans que ces changements n'aient pu être détectés avec les protocoles utilisés dans ce travail. Cependant, il est cohérent d'observer un effet des dépôts azotés plus important sur la végétation que sur le sol, notamment à court terme. D'une part, les pelouses étudiées ont un recouvrement végétal élevé. Le couvert végétal intercepte donc la majorité des dépôts atmosphériques avant qu'ils n'atteignent le sol (en dehors de la période hivernale). Nos résultats suggèrent qu'une part importante de l'azote intercepté est directement prélevée via les parties aériennes des plantes. Les plantes adaptées aux milieux oligotrophes sont en effet capables de répondre à une augmentation de la disponibilité en nutriments en les absorbant en excès par rapport à leurs besoins immédiats (« luxury consumption » ; Chapin,

1980; van Wijk et al., 2003). D'autre part, une fois absorbé, une proportion importante de l'azote est conservée dans la végétation par des processus internes de résorption et remobilisation. La part exportée dans la litière puis dans la matière organique du sol est stockée durablement, vraisemblablement en raison de faibles taux de minéralisation (Soudzilovskaia *et al.*, 2007; Bassin *et al.*, 2015). Il est probable que la teneur en azote organique du sol augmente plus que la teneur en azote minéral, mais que cette augmentation soit difficile à mettre en évidence à court terme en raison du niveau élevé d'azote organique dans ces sols. Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en azote minéral dans le sol peut être tamponnée par le prélèvement accru de la végétation (« luxury consumption » et/ou installation d'espèces avec une plus forte demande en nutriments), limitant l'apparition des phénomènes d'eutrophisation et d'acidification des sols.

La végétation répond aux apports d'azote dans les pelouses subalpines par une augmentation de la concentration en azote des tissus chez tous les groupes d'espèces et une augmentation de la biomasse et du recouvrement des Poacées (autres que *Nardus stricta*), de *Carex caryophylla* et des eudicotylédones (autres que les Fabacées, Ericacées et *Potentilla erecta*). Ainsi, ce ne sont pas les espèces dominantes de la communauté qui répondent le plus aux apports, ce qui conduit à une augmentation de l'équitabilité de la communauté à court terme. A moyen terme, une augmentation de la richesse spécifique en plantes vasculaires est observée. Parmi les espèces dont l'occurrence dans ces milieux augmente le plus sont retrouvées : *Carex caryophylla*, des Poacées (dont *Agrostis capillaris*, *Festuca nigrescens* agg., *Poa chaixii* présentes également sur le site expérimental) et de nombreuses eudicotylédones (dont *Galium* agg., *Campanula scheuchzeri*, *Pilosella officinarum* et *Veronica chamaedrys* qui étaient également présentes sur le site expérimental). Ces espèces sont pour la plupart des espèces communes à plus basse altitude et leur installation ou extension dans ces communautés conduit à une homogénéisation des nardais subalpines à l'échelle des Pyrénées. Ainsi, la réponse à moyen terme des pelouses subalpines diffère fortement de celle des prairies acides de basse altitude qui répondent à l'augmentation des dépôts azotés par une forte réduction de la diversité (Duprè et al., 2010; Maskell et al., 2010; Stevens et al., 2004c). L'absence d'acidification et d'eutrophisation du sol dans les pelouses subalpines grâce à la forte immobilisation à long terme de l'azote atmosphérique, ainsi que la limitation de la compétition pour la lumière peut expliquer le faible nombre d'espèces perdues dans ces communautés (par rapport au nombre d'espèces nouvellement installées).

L'approche expérimentale a mis en évidence des effets additifs (sur la biomasse et la hauteur de la végétation) et compensatoires (sur la concentration en azote dans les tissus

végétaux) des apports d'azote et du changement climatique, mais très peu d'interactions. L'approche empirique suggère également des effets additifs à moyen terme de ces deux composantes du changement global sur les communautés végétales des pelouses subalpines Pyrénéennes.

5.2.2. Perspectives

En France et en Europe, les émissions de NH_3 demeurent relativement stables et les émissions d'oxydes d'azote, après avoir subi une réduction marquée entre 1990 et 2009, tendent à se stabiliser également depuis 2009 (Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique, 2014; Centre on Emission Inventories and Projections, 2015). Par ailleurs, d'autres régions du monde, et notamment l'Asie, connaissent une forte augmentation des émissions d'azote anthropique associée à un fort développement démographique, économique et industriel. Ainsi, il semble actuellement peu probable d'observer dans les décennies à venir une nette réduction des dépôts atmosphériques azotés sur le massif Pyrénéen.

Nos résultats montrent que les pelouses subalpines qui ont déjà subi plusieurs décennies de dépôts azotés en raison de la pollution conservent un fort potentiel d'immobilisation de l'azote réactif atmosphérique. Ce potentiel est largement supérieur aux dépôts actuels puisqu'il permet d'immobiliser les 2/3 d'un apport artificiel de $30 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Cette capacité aurait prévenu jusqu'ici ces milieux d'une acidification et d'une eutrophisation marquée des sols. Cependant, sous l'effet conjugué des dépôts azotés et du changement climatique, des changements importants au niveau des communautés végétales ont déjà eu lieu ces dernières décennies. Nos résultats suggèrent également la possibilité d'une accélération de la perte d'espèces au-delà d'un certain seuil d'indice de fertilité de la communauté (**Figure 3.1**). Ce changement pourrait correspondre à la mise en place d'une compétition accrue pour la lumière ou bien à un effet à long terme des changements dans la composition biochimique (notamment la teneur en azote) de la végétation se répercutant sur la litière et la matière organique du sol. Les processus de dégradation et de minéralisation dans le sol pourraient en être modifiés, conduisant à la libération plus rapide de l'azote accumulé au fil du temps.

Dans une perspective de conservation et de limitation des impacts sur les pelouses subalpines Pyrénéennes, nos résultats soulignent l'importance de solutions permettant la réduction des émissions de NH_3 . En effet, à quantité d'azote égale, les apports contenant plus d'azote réduit que d'azote oxydé ont entraîné des effets plus importants sur la végétation et le sol. Cependant, la réduction des émissions d'oxydes d'azote doit être poursuivie car, moins

retenus par les pelouses, ils pourraient avoir des impacts plus importants sur les écosystèmes aquatiques.

Enfin, la gestion du pâturage est le principal levier qui peut être envisagé pour limiter à court ou moyen terme les impacts négatifs des changements globaux sur le fonctionnement et la biodiversité des pelouses subalpines. Si notre travail a permis de mettre en évidence quels étaient les impacts des dépôts azotés et du changement climatique, la question de l'influence du pâturage sur ces impacts n'a pas pu y être abordée. Dans le Chapitre 3, nous suggérons que le maintien d'un pâturage extensif dans ces habitats puisse contribuer à limiter ou ralentir la perte d'espèces en limitant la compétition pour la lumière. En revanche, l'export d'azote via le prélèvement de biomasse aérienne par le bétail est supposé faible et aurait une efficacité limitée en tant que stratégie de gestion pour limiter les effets des dépôts azotés dans ces milieux (Bassin *et al.*, 2015). Par ailleurs, nous suggérons également que le pâturage puisse faciliter l'installation des nouvelles espèces, à la fois en tant que vecteur de dispersion et en tant que perturbation du milieu. Ainsi, il est probable que l'interaction entre effets des changements globaux (dépôts azotés, changement climatique) et effets des modes et intensités de pâturage soit complexe et spécifique à chaque habitat. S'il semble évident que le maintien d'un certain niveau de pâturage est essentiel à la pérennité des nardaies subalpines dans les Pyrénées, la compréhension de cette interaction est pour l'instant relativement limitée et son étude apporterait des éléments de réponse indispensables pour pouvoir émettre des recommandations quant aux modes et intensités de pâturage les plus favorables à la conservation de ces milieux et de leur biodiversité.

Références bibliographiques

- Aerts, R. (1996) Nutrient resorption from senescing leaves of perennials: are there general patterns? *Journal of Ecology*, **84**, 597–608.
- Akima, H., Gebhardt, A., Petzoldt, T. & Maechler, M. (2013) akima: Interpolation of irregularly spaced data.
- Aronson, E.L. & McNulty, S.G. (2009) Appropriate experimental ecosystem warming methods by ecosystem, objective, and practicality. *Agricultural and Forest Meteorology*, **149**, 1791–1799.
- Atkins, C.A. (1984) Efficiencies and inefficiencies in the legume/Rhizobium symbiosis - A review. *Plant and Soil*, **82**, 273–284.
- Balestrini, R., Galli, L. & Tartari, G. (2000) Wet and dry atmospheric deposition at prealpine and alpine sites in northern Italy. *Atmospheric Environment*, **34**, 1455–1470.
- Bassin, S., Käch, D., Valsangiacomo, A., Mayer, J., Oberholzer, H.-R., Volk, M. & Fuhrer, J. (2015) Elevated ozone and nitrogen deposition affect nitrogen pools of subalpine grassland. *Environmental Pollution*, **201**, 67–74.
- Bassin, S., Schälajda, J., Vogel, A. & Suter, M. (2012) Different types of sub-alpine grassland respond similarly to elevated nitrogen deposition in terms of productivity and sedge abundance. *Journal of Vegetation Science*, **23**, 1024–1034.
- Bassin, S., Volk, M. & Fuhrer, J. (2013) Species composition of subalpine grassland is sensitive to nitrogen deposition, but not to ozone, after seven years of treatment. *Ecosystems*, **16**, 1105–1117.
- Bassin, S., Volk, M., Suter, M., Buchmann, N. & Fuhrer, J. (2007) Nitrogen deposition but not ozone affects productivity and community composition of subalpine grassland after 3 yr of treatment. *New Phytologist*, **175**, 523–34.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. (2014) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4.
- Batjes, N.H. (1996) Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *European Journal of Soil Science*, **47**, 151–163.
- Baumgardner, R.E., Isil, S.S., Lavery, T.F., Rogers, C.M. & Mohnen, V.A. (2003) Estimates of cloud water deposition at mountain acid deposition program sites in the Appalachian mountains. *Journal of the Air & Waste Management Association*, **53**, 291–308.
- Bazot, S., Mikola, J., Nguyen, C. & Robin, C. (2005) Defoliation-induced changes in carbon allocation and root soluble carbon concentration in field-grown *Lolium perenne* plants: Do they affect carbon availability, microbes and animal trophic groups in soil? *Functional Ecology*, **19**, 886–896.
- De Bello, F., Lepš, J. & Sebastià, M. (2006) Variations in species and functional plant diversity along climatic and grazing gradients. *Ecography*, **6**, 801–810.
- Belyazid, S., Kurz, D., Braun, S., Sverdrup, H., Rihm, B. & Hettelingh, J.-P. (2011) A dynamic modelling approach for estimating critical loads of nitrogen based on plant community changes under a changing climate. *Environmental Pollution*, **159**, 789–801.
- Van den Berg, L.J.L., Peters, C.J.H., Ashmore, M.R. & Roelofs, J.G.M. (2008) Reduced nitrogen has a greater effect than oxidised nitrogen on dry heathland vegetation. *Environmental Pollution*, **154**, 359–69.
- Bergstrom, A.-K. & Jansson, M. (2006) Atmospheric nitrogen deposition has caused nitrogen enrichment and eutrophication of lakes in the northern hemisphere. *Global Change Biology*, **12**, 635–643.

- Bilbrough, C., Welker, J. & Bowman, W. (2000) Early spring nitrogen uptake by snow-covered plants: a comparison of arctic and alpine plant function under the snowpack. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **32**, 404–411.
- Bivand, R., Keitt, T. & Rowlingson, B. (2014) rgdal: Bindings for the Geospatial Data Abstraction Library.
- Bobbink, R., Ashmore, M., Braun, S., Flückiger, W., Van den Wyngaert, I.J. & Den, I.J.J. Van (2002) Empirical nitrogen critical loads for natural and semi-natural ecosystems: 2002 update. Accessible à: <http://www.iap.ch/publikationen/nworkshop-background.pdf>. 1–128.
- Bobbink, R., Heil, G.W. & Raessen, M.B. (1992) Atmospheric deposition and canopy exchange processes in heathland ecosystems. *Environmental pollution*, **75**, 29–37.
- Bobbink, R., Hicks, K., Galloway, J., Spranger, T., Alkemade, R., Ashmore, M., Bustamante, M., Cinderby, S., Davidson, E., Dentener, F., Emmett, B., Erisman, J.-W., Fenn, M., Gilliam, F., Nordin, A., Pardo, L. & De Vries, W. (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological applications*, **20**, 30–59.
- Booth, M.S., Stark, J.M. & Rastetter, E. (2005) Controls on nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: A synthetic analysis of literature data. *Ecological Monographs*, **75**, 139–157.
- Bouwman, A.F., Beusen, A., Griffioen, J., Van Groenigen, J., Hefting, M., Oenema, O., Van Puijenbroek, P., Seitzinger, S., Slomp, C. & Stehfest, E. (2013) Global trends and uncertainties in terrestrial denitrification and N₂O emissions. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **368**, 20130112.
- Bowden, W.B. (1986) Gaseous nitrogen emissions from undisturbed ecosystems: An assessment of their impacts on local and global budgets. *Biogeochemistry*, **2**, 249–279.
- Bowman, W. (1992) Inputs and storage of nitrogen in winter snowpack in an alpine ecosystem. *Arctic and Alpine Research*, **24**, 211–215.
- Bowman, W., Gartner, J., Holland, K. & Wiedermann, M. (2006) Nitrogen critical loads for alpine vegetation and terrestrial ecosystem response: are we there yet? *Ecological Applications*, **16**, 1183–1193.
- Bowman, W., Theodose, T., Schardt, J. & Conant, R. (1993) Constraints of nutrient availability on primary production in two alpine tundra communities. *Ecology*, **74**, 2085–2097.
- Bowman, W.D., Cleveland, C.C., Halada, L., Hreško, J. & Baron, J.S. (2008) Negative impact of nitrogen deposition on soil buffering capacity. *Nature Geoscience*, **1**, 767–770.
- Braun-Blanquet, J. (1932) *Plant sociology. The study of plant communities*, McGraw Hil. New York.
- Britto, D.T. & Kronzucker, H.J. (2013) Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. *Annals of botany*, **112**, 957–63.
- Britton, A.J. & Fisher, J.M. (2010) Terricolous alpine lichens are sensitive to both load and concentration of applied nitrogen and have potential as bioindicators of nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, **158**, 1296–302.
- Brooks, P., Williams, M. & Schmidt, S. (1996) Microbial activity under alpine snowpacks, Niwot Ridge, Colorado. *Biogeochemistry*, **32**, 93–113.
- Brumme, R., Leimcke, U. & Matzner, E. (1992) Interception and uptake of NH₄ and NO₃ from wet deposition by above-ground parts of young beech (*Fagus silvatica* L.) trees. *Plant and Soil*, **142**, 273–279.
- Bühler, C. & Roth, T. (2011) Spread of common species results in local-scale floristic homogenization in grassland of Switzerland. *Diversity and Distributions*, **17**, 1089–1098.
- Butterbach-Bahl, K., Baggs, E.M., Dannenmann, M., Kiese, R. & Zechmeister-Boltenstern, S. (2013) Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **368**, 20130122.

- Butterbach-Bahl, K., Gundersen, P., Ambus, P., Augustin, J., Beier, C., Boeckx, P., Dannenmann, M., Gimeno, B.S., Ibrom, A., Kiese, R., Kitzler, B., Rees, R.M., Smith, K.A., Stevens, C., Vesala, T. & Zechmeister-Boltenstern, S. (2011) *Nitrogen processes in terrestrial ecosystems. The European Nitrogen Assessment: Sources, Effects and Policy Perspectives* (ed. by M.A. Sutton, C.M. Howard, J.W. Erisman, G. Billen, A. Bleeker, P. Grennfelt, H. van Grinsven, and B. Grizzetti), pp. 99–125. Cambridge University Press.
- Camarero, L. & Catalan, J. (1993) Chemistry of bulk precipitation in the central and eastern Pyrenees, northeast Spain. *Atmospheric Environment*, **27**, 83–94.
- Cannone, N. & Pignatti, S. (2014) Ecological responses of plant species and communities to climate warming: upward shift or range filling processes? *Climatic Change*, **123**, 201–214.
- Cape, J.N., van der Eerden, L.J., Sheppard, L.J., Leith, I.D. & Sutton, M.A. (2009) Evidence for changing the critical level for ammonia. *Environmental Pollution*, **157**, 1033–7.
- Casper, B.B. & Jackson, R.B. (1997) Plant Competition Underground. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**, 545–570.
- Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (2014) Acidification, eutrophisation et pollution photochimique. Accessible à: <http://www.citepa.org/fr/air-et-climat/polluants/aep-item>.
- Centre on Emission Inventories and Projections (2015) Emissions as used in EMEP models. Accessible à: http://www.ceip.at/ms/ceip_home1/ceip_home/webdab_emepdatabase/emissions_emepmodels/.
- Chapin, F.S. (1980) The Mineral Nutrition of Wild Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**, 233–260.
- Chapin, F.S., Bloom, A.J., Field, C.B. & Waring, R.H. (1987) Plant Responses to Multiple Environmental Factors : Physiological ecology provides tools for studying how interacting environmental resources control plant growth. *BioScience*, **37**, 49–57.
- Chapin, F.S., Moilanen, L. & Kielland, K. (1993) Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature*, **361**, 150–153.
- Chytrý, M. (2001) Phytosociological data give biased estimates of species richness. *Journal of Vegetation Science*, **12**, 439–444.
- Chytrý, M., Tichý, L., Hennekens, S.M. & Schaminée, J.H.J. (2014) Assessing vegetation change using vegetation-plot databases: a risky business. *Applied Vegetation Science*, **17**, 32–41.
- Clark, C.M., Cleland, E.E., Collins, S.L., Fargione, J.E., Gough, L., Gross, K.L., Pennings, S.C., Suding, K.N. & Grace, J.B. (2007) Environmental and plant community determinants of species loss following nitrogen enrichment. *Ecology letters*, **10**, 596–607.
- Clark, C.M. & Tilman, D. (2008) Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, **451**, 712–5.
- Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schimel, D.S., Fisher, H., Hedin, L.O., Perakis, S., Latty, E.F., Fischer, C. Von, Elseroad, A. & Wasson, M.F. (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, **13**, 623–645.
- Costa, E., Pérez, J. & Kreft, J.U. (2006) Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends in Microbiology*, **14**, 213–219.
- Crittenden, P. (1998) Nutrient exchange in an Antarctic macrolichen during summer snowfall–snow melt events. *New Phytologist*, **139**, 697–707.
- Crittenden, P.D. (1989) *Nitrogen relations of mat-forming lichens. Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi*, pp. 243–268. Cambridge University Press, Cambridge.
- Curtis, C.J., Botev, I., Camarero, L., Catalan, J., Cogalniceanu, D., Hughes, M., Kernan, M., Kopáček, J., Korhola, A., Psenner, R., Rogora, M., Stuchlík, E., Veronesi, M. & Wright,

- R.F. (2005) Acidification in European mountain lake districts: a regional assessment of critical load exceedance. *Aquatic Sciences*, **67**, 237–251.
- Dahlman, L., Persson, J., Palmqvist, K. & Näsholm, T. (2004) Organic and inorganic nitrogen uptake in lichens. *Planta*, **219**, 459–67.
- Dämmgen, U., Erisman, J.W., Cape, J.N., Grünhage, L. & Fowler, D. (2005) Practical considerations for addressing uncertainties in monitoring bulk deposition. *Environmental Pollution*, **134**, 535–48.
- Davidson, E.A. (1994) *Climate change and soil microbial processes: secondary effects are hypothesised from better known interacting primary effects. Soil response to climate change* (ed. by M.D.A. Rounsevell and P.J. Loveland), pp. 156–168. Springer, Berlin.
- Davies, C.E., Moss, D. & Hill, M.O. (2004) *EUNIS Habitat Classification Revised 2004*, Report to: European Environment Agency and European Topic Centre on Nature Protection and Biodiversity.
- Dise, N.B., Ashmore, M., Belyazid, S., Bleeker, A., Bobbink, R., de Vries, W., Erisman, J.W., Spranger, T., Stevens, C.J. & van den Berg, L. (2011) *Nitrogen as a threat to European terrestrial biodiversity. The European Nitrogen Assessment: Sources, Effects and Policy Perspectives*, pp. 463–494. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dise, N.B., Rothwell, J.J., Gauci, V., van der Salm, C. & de Vries, W. (2009) Predicting dissolved inorganic nitrogen leaching in European forests using two independent databases. *Science of the Total Environment*, **407**, 1798–1808.
- Duprê, C., Stevens, C.J., Ranke, T., Bleeker, A., Peppeler-Lisbach, C., Gowing, D.J.G., Dise, N.B., Dorland, E., Bobbink, R. & Diekmann, M. (2010) Changes in species richness and composition in European acidic grasslands over the past 70 years: the contribution of cumulative atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology*, **16**, 344–357.
- Ellenberg, H., Weber, H., Düll, R., Wirth, V., Werner, W. & Paulissen, D. (1992) Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. 2nd ed. *Scripta Geobotanica*, **18**, 1–248.
- Ellis, C.J., Crittenden, P.D. & Scrimgeour, C.M. (2004) Soil as a potential source of nitrogen for mat-forming lichens. *Canadian Journal of Botany*, **82**, 145–149.
- Elser, J.J., Bracken, M.E.S., Cleland, E.E., Gruner, D.S., Harpole, W.S., Hillebrand, H., Ngai, J.T., Seabloom, E.W., Shurin, J.B. & Smith, J.E. (2007) Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, **10**, 1135–42.
- EMEP (2013) EMEP Home. Accessible à: <http://www.emep.int/>.
- Erisman, J.W., Bleeker, A., Galloway, J. & Sutton, M.S. (2007) Reduced nitrogen in ecology and the environment. *Environmental pollution*, **150**, 140–9.
- Evans, J.R. (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia*, **78**, 9–19.
- Fageria, N.K., Filho, M.P.B., Moreira, A. & Guimarães, C.M. (2009) Foliar Fertilization of Crop Plants. *Journal of Plant Nutrition*, **32**, 1044–1064.
- Fagerli, H., Schulz, M., Gauss, M., Tsyro, S., Jonson, J.E., Benedictow, A., Semeena, V.S., Wind, P. & Olivié, D. (2014) *Transboundary particulate matter, photo-oxidants, acidifying and eutrophying components*, Oslo, Norway.
- Fenn, M.E., Geiser, L., Bachman, R., Blubaugh, T.J. & Bytnerowicz, A. (2007) Atmospheric deposition inputs and effects on lichen chemistry and indicator species in the Columbia River Gorge, USA. *Environmental Pollution*, **146**, 77–91.
- Fenn, M.E. & Poth, M.A. (2004) Monitoring nitrogen deposition in throughfall using ion exchange resin columns: a field test in the San Bernardino mountains. *Journal of Environmental Quality*, **33**, 2007–2014.
- Fernández, V. & Brown, P.H. (2013) From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Frontiers in plant science*, **4**, 289.

- Fernández, V. & Eichert, T. (2009) Uptake of Hydrophilic Solutes Through Plant Leaves: Current State of Knowledge and Perspectives of Foliar Fertilization. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **28**, 36–68.
- Fondazione Salvatore Maugeri - IRCCS (2006) *Radiello's Manual*. v. 01 - 2006, Accessible à: [http://www.radiello.com/english/Radiello's manual 01-06.pdf](http://www.radiello.com/english/Radiello's%20manual%2001-06.pdf).
- De Foucault, B. (2012) Contribution au prodrome des végétations de France : les Nardetea strictae Rivas Goday in Rivas Goday & Rivas-Mart. 1963. *Journal de Botanique de la Société Botanique de France*, **59**, 241–344.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M.A., Cape, J.N., Reis, S., Sheppard, L.J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J.N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A.F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M. & Voss, M. (2013) The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **368**, 20130164.
- Frati, L., Brunialti, G., Gaudino, S., Pati, A., Rosamilia, S. & Loppi, S. (2011) Accumulation of nitrogen and changes in assimilation pigments of lichens transplanted in an agricultural area. *Environmental monitoring and assessment*, **178**, 19–24.
- Frati, L., Santoni, S., Nicolardi, V., Gaggi, C., Brunialti, G., Guttova, A., Gaudino, S., Pati, A., Pirintsos, S.A. & Loppi, S. (2007) Lichen biomonitoring of ammonia emission and nitrogen deposition around a pig stockfarm. *Environmental Pollution*, **146**, 311–6.
- Friedrich, U., Falk, K., Bahlmann, E., Marquardt, T., Meyer, H., Niemeyer, T., Schemmel, S., von Oheimb, G. & Härdtle, W. (2011) Fate of airborne nitrogen in heathland ecosystems: a ¹⁵N tracer study. *Global Change Biology*, **17**, 1549–1559.
- Füssel, H., Jol, A., Kurnik, B. & Hemming, D. (2012) *Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2012: an indicator-based report.*, Copenhagen.
- Galloway, J., Dentener, F. & Capone, D. (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, **70**, 153–226.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L. a, Seitzinger, S.P. & Sutton, M.A. (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, **320**, 889–92.
- García-Gómez, H., Garrido, J.L., Vivanco, M.G., Lassaletta, L., Rábago, I., Avila, A., Tsyro, S., Sánchez, G., González Ortiz, A., González-Fernández, I. & Alonso, R. (2014) Nitrogen deposition in Spain: Modeled patterns and threatened habitats within the Natura 2000 network. *The Science of the total environment*, **485-486**, 450–460.
- Gargominy, O., Tercerie, S., Régnier, C., Ramage, T., Schoelinck, C., Dupont, P., Vandel, E., Daszkiewicz, P. & Poncet, L. (2014) *TAXREF v8.0, référentiel taxonomique pour la France : méthodologie, mise en oeuvre et diffusion*, Paris.
- Gaudio, N., Belyazid, S., Gendre, X., Mansat, A., Nicolas, M., Rizzetto, S., Sverdrup, H., Probst, A. (2015) Combined effect of atmospheric nitrogen deposition and climate change on temperate forest soil biogeochemistry: a modelling approach. *Ecological Modelling*, **306**, 24–34.
- Gaudnik, C. (2011) *Impacts des depots d'azote atmospherique sur la vegetation des prairies acides du domaine atlantique français - Approche comparative et expérimentale -*, Université Bordeaux 1, Talence.
- Gaudnik, C., Corcket, E., Clément, B., Delmas, C.E.L., Gombert-Courvoisier, S., Muller, S., Stevens, C.J. & Alard, D. (2011) Detecting the footprint of changing atmospheric nitrogen deposition loads on acid grasslands in the context of climate change. *Global Change Biology*, **17**, 3351–3365.
- George, E., Stober, C. & Seith, B. (1999) The use of different soil nitrogen sources by young Norway spruce plants. *Trees*, **13**, 199.
- Gerosa, G., Finco, A., Marzuoli, R., Ferretti, M. & Gottardini, E. (2012) Errors in ozone risk assessment using standard conditions for converting ozone concentrations obtained by

- passive samplers in mountain regions. *Journal of Environmental Monitoring*, **14**, 1703–1709.
- Gerzabek, M.H., Haberhauer, G., Stemmer, M., Klepsch, S. & Haunold, E. (2004) Long-term behaviour of 15 N in an alpine grassland ecosystem. *Biogeochemistry*, **70**, 59–69.
- Gojon, A., Bussi, C., Grignon, C. & Salsac, L. (1991) Distribution of NO₃ reduction between roots and shoots of peach- tree seedlings as affected by NO₃ uptake rate. *Physiologia Plantarum*, **82**, 505–512.
- Gombert, S., Asta, J. & Seaward, M.R.D. (2003) Correlation between the nitrogen concentration of two epiphytic lichens and the traffic density in an urban area. *Environmental Pollution*, **123**, 281–90.
- Gottfried, M., Pauli, H., Futschik, A., Akhalkatsi, M., Barančok, P., Benito Alonso, J.L., Coldea, G., Dick, J., Erschbamer, B., Fernández Calzado, M.R., Kazakis, G., Krajčič, J., Larsson, P., Mallaun, M., Michelsen, O., Moiseev, D., Moiseev, P., Molau, U., Merzouki, A., Nagy, L., Nakhutsrishvili, G., Pedersen, B., Pelino, G., Puscas, M., Rossi, G., Stanisci, A., Theurillat, J.-P., Tomaselli, M., Villar, L., Vittoz, P., Vogiatzakis, I. & Grabherr, G. (2012) Continent-wide response of mountain vegetation to climate change. *Nature Climate Change*, **2**, 111–115.
- Grime, J.P. (1977) Evidence for the Existence of Three Primary Strategies in Plants and Its Relevance to Ecological and Evolutionary Theory. *The American Naturalist*, **111**, 1169.
- Guenther, A., Karl, T., Harley, P., Wiedinmyer, C., Palmer, P.I. & Geron, C. (2006) Estimates of global terrestrial isoprene emissions using MEGAN (Model of Emissions of Gases and Aerosols from Nature). *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, **6**, 3181–3210.
- Gultepe, I., Tardif, R., Michaelides, S.C., Cermak, J., Bott, a., Bendix, J., Müller, M.D., Pagowski, M., Hansen, B., Ellrod, G., Jacobs, W., Toth, G. & Cober, S.G. (2007) Fog Research: A Review of Past Achievements and Future Perspectives. *Pure and Applied Geophysics*, **164**, 1121–1159.
- Hautier, Y., Niklaus, P.A. & Hector, A. (2009) Competition for light causes plant biodiversity loss after eutrophication. *Science*, **324**, 636–8.
- Heer, C. & Körner, C. (2002) High elevation pioneer plants are sensitive to mineral nutrient addition. *Basic and Applied Ecology*, **47**, 39–47.
- Van Herk, C., Mathijssen-Spiekman, E., de Zwart, D., Vanherk, C., Mathijssenspiekman, E. & Dezwart, D. (2003) Long distance nitrogen air pollution effects on lichens in Europe. *Lichenologist*, **35**, 347–359.
- Herrera, S., Gutiérrez, J.M., Ancell, R., Pons, M.R., Frías, M.D. & Fernández, J. (2012) Development and analysis of a 50-year high-resolution daily gridded precipitation dataset over Spain (Spain02). *International Journal of Climatology*, **32**, 74–85.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B. & Boddey, R.M. (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, **311**, 1–18.
- Hertel, O., Reis, S., Skjoth, C.A., Bleeker, A., Harrison, R., Cape, J.N., Fowler, D., Skiba, U., Simpson, D., Jickells, T., Baker, A., Kulmala, M., Gyldenkaerne, S., Sorensen, L.L. & Erisman, J.W. (2011) *Nitrogen processes in the atmosphere. The European Nitrogen Assessment: Sources, Effects and Policy Perspectives*, pp. 177–208. Cambridge University Press.
- Hiltbrunner, E., Schwikowski, M. & Körner, C. (2005) Inorganic nitrogen storage in alpine snow pack in the Central Alps (Switzerland). *Atmospheric Environment*, **39**, 2249–2259.
- Hjellbrekke, A. & Fjaeraa, A.M. (2013) *Data Report 2011: Acidifying and eutrophying compounds and particulate matter*, Kjeller, Norway.
- Hobbie, S.E., Shevtsova, A. & Chapin, F.S. (1999) Plant responses to species removal and experimental warming in Alaskan tussock tundra. *Oikos*, **84**, 417–434.

- Hogan, E.J., Minnullina, G., Sheppard, L.J., Leith, I.D. & Crittenden, P.D. (2010) Response of phosphomonoesterase activity in the lichen *Cladonia portentosa* to nitrogen and phosphorus enrichment in a field manipulation experiment. *New Phytologist*, **186**, 926–33.
- Hooper, D.U. (1998) The role of complementarity and competition in ecosystem responses to variation in plant diversity. *Ecology*, **79**, 704–719.
- Horswill, P., O’Sullivan, O., Phoenix, G.K., Lee, J.A. & Leake, J.R. (2008) Base cation depletion, eutrophication and acidification of species-rich grasslands in response to long-term simulated nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, **155**, 336–49.
- Hutchison, J.S. & Henry, H.A.L. (2010) Additive Effects of Warming and Increased Nitrogen Deposition in a Temperate Old Field: Plant Productivity and the Importance of Winter. *Ecosystems*, **13**, 661–672.
- Hyvärinen, M. (1997) *Modified element distributions in Cladonia portentosa as indices of acid and nitrogen deposition in the British Isles.*, University of Nottingham.
- Hyvärinen, M. & Crittenden, P. (1998) Relationships between atmospheric nitrogen inputs and the vertical nitrogen and phosphorus concentration gradients in the lichen *Cladonia portentosa*. *New Phytologist*, **140**, 519–530.
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: The physical science basis*, (ed. by S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, and H.L. Miller) Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.
- Jaeger, C.H. & Monson, R.K. (1992) Adaptive significance of nitrogen storage in *Bistorta bistortoides*, an alpine herb. *Oecologia*, **92**, 578–585.
- Jarvis, S.C., Stockdale, E.A., Shepherd, M.A. & Powlson, D.S. (1996) Nitrogen mineralisation in temperate agricultural soils: processes and measurement. *Advances in Agronomy*, **57**, 187–235.
- Johansson, O., Nordin, A., Olofsson, J. & Palmqvist, K. (2010) Responses of epiphytic lichens to an experimental whole-tree nitrogen-deposition gradient. *New Phytologist*, **188**, 1075–84.
- Johnson, D., Leake, J.R., Lee, J.A. & Campbell, C.D. (1998) Changes in soil microbial biomass and microbial activities in response to 7 years simulated pollutant nitrogen deposition on a heathland and two grasslands. *Environmental Pollution*, **103**, 239–250.
- Julve, P. (1998) Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version 2013. Accessible à: <http://perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat.htm>.
- Jurasinski, G. & Retzer, V. (2012) A Collection of functions for similarity analysis of vegetation data (simba).
- Kirchner, M., Fegg, W., Römmelt, H., Leuchner, M., Ries, L., Zimmermann, R., Michalke, B., Wallasch, M., Maguhn, J., Faus-Kessler, T. & Jakobi, G. (2014) Nitrogen deposition along differently exposed slopes in the Bavarian Alps. *The Science of the total environment*, **470-471**, 895–906.
- Kirschbaum, M.U.F. (1995) The temperature dependence of soil organic matter decomposition, and the effect of global warming on soil organic C storage. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**, 753–760.
- Kleijn, D., Bekker, R.M., Bobbink, R., De Graaf, M.C.C. & Roelofs, J.G.M. (2008) In search for key biogeochemical factors affecting plant species persistence in heathland and acidic grasslands: a comparison of common and rare species. *Journal of Applied Ecology*, **45**, 680–687.
- Knops, J.M.H., Nash III, T.H., Boucher, V.L. & Schlesinger, W.H. (1991) Mineral Cycling and Epiphytic Lichens: Implications at the Ecosystem Level. *Lichenologist*, **23**, 309–321.
- Körner, C. (1999) *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*, 1st edn. Springer.
- Körner, C. (1989) The nutritional status of plants from high altitudes. *Oecologia*, **81**, 379–391.

- Körner, C., Diemer, M., Schächli, B., Niklaus, P. & Arnone III, J. (1997) The responses of alpine grassland to four seasons of CO₂ enrichment: a synthesis. *Acta Oecologica*, **18**, 165–175.
- Körner, C. & Larcher, W. (1988) Plant life in cold climates. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **42**, 25–57.
- Krupa, S. V. (2003) Effects of atmospheric ammonia (NH₃) on terrestrial vegetation: a review. *Environmental Pollution*, **124**, 179–221.
- Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Woebken, D., Schmid, M., Fuchs, B.M., Fuchs, B.M., Amann, R., Jørgensen, B.B. & Jetten, M.S.M. (2005) Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 6478–83.
- Kuznetsova, A., Bruun Brockhoff, P. & Haubo Bojesen Christensen, R. (2014) lmerTest: Tests for random and fixed effects for linear mixed effect models (lmer objects of lme4 package).
- Kytöviita, M.-M. & Crittenden, P.D. (2007) Growth and nitrogen relations in the mat-forming lichens *Stereocaulon paschale* and *Cladonia stellaris*. *Annals of botany*, **100**, 1537–45.
- Lamaze, T., Pasche, F. & Pornon, A. (2003) Uncoupling nitrogen requirements for spring growth from root uptake in a young evergreen shrub (*Rhododendron ferrugineum*). *New Phytologist*, **159**, 637–644.
- Lenoir, J., Gégout, J.C., Marquet, P.A., de Ruffray, P. & Brisse, H. (2008) A significant upward shift in plant species optimum elevation during the 20th century. *Science*, **320**, 1768–71.
- LMD (Laboratoire de Météorologie Dynamique) (2014) The Chimere chemistry-transport model. Accessible à: <http://www.lmd.polytechnique.fr/chimere>.
- Löflund, M., Kasper-Giebl, A., Stopper, S., Urban, H., Biebl, P., Kirchner, M., Braeutigam, S. & Puxbaum, H. (2002) Monitoring ammonia in urban, inner alpine and pre-alpine ambient air. *Journal of Environmental Monitoring*, **4**, 205–209.
- Lovett, G. & Kinsman, J. (1990) Atmospheric pollutant deposition to high-elevation ecosystems. *Atmospheric Environment*, **24A**, 2767–2786.
- Maathuis, F.J. (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 250–258.
- Marion, G., Henry, G., Freckman, D., Johnstone, J., Jones, G., Jones, M., Lévesque, E., Molau, U., Molgaard, P., Parsons, A., Svoboda, J. & Virginia, R. (1997) Open-top designs for manipulating field temperature in high latitude ecosystems. *Global Change Biology*, **3**, 20–32.
- Markert, B., Breure, A. & Zechmeister, H. (2003) *Bioindicators & Biomonitors, Principles, Concepts and Applications*, Elsevier. (ed. by B. Markert, A. Breure, and H. Zechmeister) Elsevier Science Ltd., Oxford.
- Marschner, H., Häussling, M. & George, E. (1991) Ammonium and nitrate uptake rates and rhizosphere pH in non-mycorrhizal roots of Norway spruce. *Trees*, **5**, 14–21.
- Marty, C., Pornon, A. & Lamaze, T. (2009) High NH₄⁺ efflux from roots of the common alpine grass, *Festuca nigrescens*, at field-relevant concentrations restricts net uptake. *Environmental and Experimental Botany*, **67**, 84–86.
- Maskell, L.C., Smart, S.M., Bullock, J.M., Thompson, K. & Stevens, C.J. (2010) Nitrogen deposition causes widespread loss of species richness in British habitats. *Global Change Biology*, **16**, 671–679.
- McKane, R.B., Johnson, L.C., Shaver, G.R., Nadelhoffer, K.J., Rastetter, E.B., Fry, B., Giblin, A.E., Kielland, K., Kwiatkowski, B.L., Laundre, J.A. & Murray, G. (2002) Resource-based niches provide a basis for plant species diversity and dominance in arctic tundra. *Nature*, **415**, 68–71.
- McMurray, J.A., Roberts, D.W., Fenn, M.E., Geiser, L.H. & Jovan, S. (2013) Using Epiphytic Lichens to Monitor Nitrogen Deposition Near Natural Gas Drilling Operations in the Wind River Range, WY, USA. *Water, Air, & Soil Pollution*, **224**, 1487.

- Menut, L., Bessagnet, B., Khvorostyanov, D., Beekmann, M., Blond, N., Colette, A., Coll, I., Curci, G., Foret, G., Hodzic, A., Mailler, S., Meleux, F., Monge, J.-L., Pison, I., Siour, G., Turquety, S., Valari, M., Vautard, R. & Vivanco, M.G. (2013) CHIMERE 2013: a model for regional atmospheric composition modelling. *Geoscientific Model Development*, **6**, 981–1028.
- Millard, P. (1988) The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant Cell and Environment*, **11**, 1–8.
- Miller, A. & Bowman, W. (2003) Alpine plants show species-level differences in the uptake of organic and inorganic nitrogen. *Plant and Soil*, **250**, 283–292.
- Miller, A. & Bowman, W. (2002) Variation in nitrogen-15 natural abundance and nitrogen uptake traits among co-occurring alpine species: do species partition by nitrogen form? *Oecologia*, **130**, 609–616.
- Miller, A., Bowman, W. & Suding, K. (2007) Plant uptake of inorganic and organic nitrogen: neighbor identity matters. *Ecology*, **88**, 1832–1840.
- Mokany, K., Raison, R.J. & Prokushkin, A.S. (2006) Critical analysis of root: Shoot ratios in terrestrial biomes. *Global Change Biology*, **12**, 84–96.
- Moncoulon, D., Probst, A. & Party, J.-P. (2004) Weathering, atmospheric deposition and vegetation uptake: role for ecosystem sensitivity to acid deposition and critical load. *Comptes Rendus Geoscience*, **336**, 1417–1426.
- Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A. & Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, **16**, 177–183.
- Müller, C., Abbasi, M.K., Kammann, C., Clough, T.J., Sherlock, R.R., Stevens, R.J. & Jäger, H.-J. (2004) Soil Respiratory Quotient Determined via Barometric Process Separation Combined with Nitrogen-15 Labeling. *Soil Science Society of America Journal*, **68**, 1610.
- Müller, C., Rütting, T., Kattge, J., Laughlin, R.J. & Stevens, R.J. (2007) Estimation of parameters in complex ¹⁵N tracing models by Monte Carlo sampling. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**, 715–726.
- Munzi, S., Paoli, L., Fiorini, E. & Loppi, S. (2012) Physiological response of the epiphytic lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. to ecologically relevant nitrogen concentrations. *Environmental Pollution*, **171**, 25–9.
- Munzi, S., Pisani, T., Paoli, L., Renzi, M. & Loppi, S. (2013) Effect of nitrogen supply on the C / N balance in the lichen *Evernia prunastri* (L .) Ach . *Turkish Journal of Biology*, **37**, 165–170.
- Myrold, D.D. & Posavatz, N.R. (2007) Potential importance of bacteria and fungi in nitrate assimilation in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**, 1737–1743.
- Nash III, T.H. (2008) *Lichen biology*, Second Edi. (ed. by T.H. Nash III) Cambridge University Press, Cambridge.
- Nemergut, D.R., Townsend, A.R., Sattin, S.R., Freeman, K.R., Fierer, N., Neff, J.C., Bowman, W.D., Schadt, C.W., Weintraub, M.N. & Schmidt, S.K. (2008) The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: implications for carbon and nitrogen cycling. *Environmental microbiology*, **10**, 3093–105.
- Nilsson, J. (1988) *Critical Loads for Sulphur and Nitrogen*. *Air Pollution and Ecosystems SE - 11* (ed. by P. Mathy), pp. 85–91. Springer Netherlands.
- Norby, R.J. & O’Neill, E.G. (1991) Leaf area compensation and nutrient interactions in CO₂-enriched seedlings of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). *New Phytologist*, **117**, 515–528.
- Nordin, A., Strengbom, J. & Ericson, L. (2006) Responses to ammonium and nitrate additions by boreal plants and their natural enemies. *Environmental Pollution*, **141**, 167–74.

- Ochoa-Hueso, R., Mejías-Sanz, V., Pérez-Corona, M.E. & Manrique, E. (2013) Nitrogen deposition effects on tissue chemistry and phosphatase activity in *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd., a common terricolous lichen of semi-arid Mediterranean shrublands. *Journal of Arid Environments*, **88**, 78–81.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. & Wagner, H. (2013) vegan: Community Ecology Package.
- Olsen, H.B., Berthelsen, K., Andersen, H.V. & Søbchting, U. (2010) Xanthoria parietina as a monitor of ground-level ambient ammonia concentrations. *Environmental Pollution*, **158**, 455–61.
- Onipchenko, V.G., Makarov, M.I., Akhmetzhanova, A.A., Soudzilovskaia, N.A., Aibazova, F.U., Elkanova, M.K., Stogova, A. V. & Cornelissen, J.H.C. (2012) Alpine plant functional group responses to fertiliser addition depend on abiotic regime and community composition. *Plant and Soil*, **357**, 103–115.
- Onipchenko, V.G., Makarov, M.I., van Logtestijn, R.S.P., Ivanov, V.B., Akhmetzhanova, A.A., Tekeev, D.K., Ermak, A.A., Salpagarova, F.S., Kozhevnikova, A.D. & Cornelissen, J.H.C. (2009) New nitrogen uptake strategy: specialized snow roots. *Ecology letters*, **12**, 758–64.
- Parolo, G. & Rossi, G. (2008) Upward migration of vascular plants following a climate warming trend in the Alps. *Basic and Applied Ecology*, **9**, 100–107.
- Pasche, F., Armand, M., Gouaux, P., Lamaze, T. & Pornon, A. (2004) Are meadows with high ecological and patrimonial value endangered by heathland invasion in the French central Pyrenees? *Biological Conservation*, **118**, 101–108.
- Pauli, H., Gottfried, M., Dullinger, S., Abdaladze, O., Akhalkatsi, M., Benito Alonso, J.L., Coldea, G., Dick, J., Erschbamer, B., Fernández Calzado, R., Ghosn, D., Holten, J.I., Kanka, R., Kazakis, G., Kollár, J., Larsson, P., Moiseev, P., Moiseev, D., Molau, U., Molero Mesa, J., Nagy, L., Pelino, G., Puşcaş, M., Rossi, G., Stanisci, A., Syverhuset, A.O., Theurillat, J.-P., Tomaselli, M., Unterluggauer, P., Villar, L., Vittoz, P. & Grabherr, G. (2012) Recent plant diversity changes on Europe's mountain summits. *Science*, **336**, 353–5.
- Payne, R.J., Dise, N.B., Stevens, C.J. & Gowing, D.J. (2013) Impact of nitrogen deposition at the species level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 984–7.
- Pearson, B.Y.J. & Stewart, G.R. (1993) The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytologist*, **125**, 283–305.
- Perakis, S.S. & Hedin, L.O. (2002) Nitrogen loss from unpolluted South American forests mainly via dissolved organic compounds. *Nature*, **415**, 416–419.
- Peuke, A.D., Jeschke, W.D., Dietz, K.-J., Schreiber, L. & Hartung, W. (1998) Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis* L. Carbon and nitrogen uptake and inflows. *New Phytologist*, **138**, 675–687.
- Phoenix, G.K., Emmett, B.A., Britton, A.J., Caporn, S.J.M., Dise, N.B., Helliwell, R., Jones, L., Leake, J.R., Leith, I.D., Sheppard, L.J., Sowerby, A., Pilkington, M.G., Rowe, E.C., Ashmore, M.R. & Power, S.A. (2012) Impacts of atmospheric nitrogen deposition: responses of multiple plant and soil parameters across contrasting ecosystems in long-term field experiments. *Global Change Biology*, **18**, 1197–1215.
- Phoenix, G.K., Hicks, W.K., Cinderby, S., Kuylenstierna, J.C.I., Stock, W.D., Dentener, F.J., Giller, K.E., Austin, A.T., Lefroy, R.D.B., Gimeno, B.S., Ashmore, M.R. & Ineson, P. (2006) Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology*, **12**, 470–476.

- Pornon, A., Escaravage, N. & Lamaze, T. (2007) Complementarity in mineral nitrogen use among dominant plant species in a subalpine community. *American Journal of Botany*, **94**, 1778–1785.
- Porter, E.M., Bowman, W.D., Clark, C.M., Compton, J.E., Pardo, L.H. & Soong, J.L. (2012) Interactive effects of anthropogenic nitrogen enrichment and climate change on terrestrial and aquatic biodiversity. *Biogeochemistry*, **114**, 93–120.
- Posch, M. *et al.* (2004) Mapping Critical Loads, Chap. V, V - 10 - V - 28, in: Spranger, T., Lorenz, U., Gregor, H. - D. (Eds). Manual on methodologies and criteria for Modelling and Mapping Critical Loads & Levels and Air Pollution Effects, Risks and Trends, 52/02, ISBN: 0722-186X, 266 p
- Price, M. & Waser, N. (2000) Responses of subalpine meadow vegetation to four years of experimental warming. *Ecological Applications*, **10**, 811–823.
- Probst, A. & Leguédais, S. (2008) in: Critical load, dynamic modelling and impact assessment in Europe. CCE status report. Hettelingh, J.-P., Slootweg, J. & Posch, M. (Eds) 133–40.
- Quintana-Seguí, P., Le Moigne, P., Durand, Y., Martin, E., Habets, F., Baillon, M., Canellas, C., Franchisteguy, L. & Morel, S. (2008) Analysis of Near-Surface Atmospheric Variables: Validation of the SAFRAN Analysis over France. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*, **47**, 92–107.
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing.
- Raymond, B.A., Bassingthwaite, T. & Shaw, P.D. (2010) Measuring nitrogen and sulphur deposition in the Georgia Basin, British Columbia, using lichens and moss. *Journal of Limnology*, **69**, 22–32.
- Recous, S., Mary, B. & Faurie, G. (1990) Microbial immobilization of ammonium and nitrate in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **22**, 913–922.
- Remke, E., Brouwer, E., Kooijman, A., Blindow, I., Esselink, H. & Roelofs, J.G.M. (2009) Even low to medium nitrogen deposition impacts vegetation of dry, coastal dunes around the Baltic Sea. *Environmental pollution*, **157**, 792–800.
- Rich, T., Redbane, M., Fasham, M., McMeechan, F. & Dobson, D. (2005) *Ground and shrub vegetation. Handbook of Biodiversity Methods: Survey, Evaluation and Monitoring* (ed. by D. Hill, M. Fasham, G. Tucker, M. Shewry, and P. Shaw), pp. 201–222. Cambridge University Press, Cambridge.
- Roberts, D.W. (2013) labdsv: Ordination and Multivariate Analysis for Ecology.
- Roelofs, J.G.M., Kempers, A.J., Houdijk, A.L.F.M. & Jansen, J. (1985) The effect of air-borne ammonium sulphate on *Pinus nigra* var. *maritima* in the Netherlands. *Plant and Soil*, **84**, 45–56.
- Root, H.T., Geiser, L.H., Fenn, M.E., Jovan, S., Hutten, M.A., Ahuja, S., Dillman, K., Schirokauer, D., Berryman, S. & McMurray, J.A. (2013) A simple tool for estimating throughfall nitrogen deposition in forests of western North America using lichens. *Forest Ecology and Management*, **306**, 1–8.
- Ross, L.C., Woodin, S.J., Hester, A.J., Thompson, D.B.A. & Birks, H.J.B. (2012) Biotic homogenization of upland vegetation: Patterns and drivers at multiple spatial scales over five decades. *Journal of Vegetation Science*, **23**, 755–770.
- Rustad, L.E., Campbell, J.L., Marion, G.M., Norby, R.J., Mitchell, M.J., Hartley, A.E., Cornelissen, J.H.C., Gurevitch, J. & GCTE-NEWS (2001) A meta-analysis of the response of soil respiration, net nitrogen mineralization, and aboveground plant growth to experimental ecosystem warming. *Oecologia*, **126**, 543–562.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M. & Wall, D.H. (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, **287**, 1770–4.

- Schäppi, B. & Körner, C.H. (1997) In situ effects of elevated CO₂ on the carbon and nitrogen status of alpine plants. *Functional Ecology*, **11**, 290–299.
- Schmidt, I.K., Jonasson, S. & Michelsen, A. (1999) Mineralization and microbial immobilization of N and P in arctic soils in relation to season, temperature and nutrient amendment. *Applied Soil Ecology*, **11**, 147–160.
- Sebastià, M.-T., de Bello, F., Puig, L. & Taull, M. (2008a) Grazing as a factor structuring grasslands in the Pyrenees. *Applied Vegetation Science*, **11**, 215–222.
- Sebastià, M.-T., Kirwan, L., Connolly, J., Group, E.M. & Castle, J. (2008b) Strong shifts in plant diversity and vegetation composition in grassland shortly after climatic change. *Journal of Vegetation Science*, **19**, 299–306.
- Seitzinger, S., Harrison, J.A., Böhlke, J.K., Bouwman, A.F., Lowrance, R., Peterson, B., Tobias, C. & Drecht, G. Van (2006) Denitrification Across Landscapes and Waterscapes: a Synthesis. *Ecological Applications*, **16**, 2064–2090.
- Sheppard, L.J., Leith, I.D., Crossley, A., Dijk, N. Van, Cape, J.N., Fowler, D. & Sutton, M.A. (2009) Long-Term Cumulative Exposure Exacerbates the Effects of Atmospheric Ammonia on an Ombrotrophic Bog: Implications for Critical Levels. *Atmospheric Ammonia: Detecting Emission Changes and Environmental Impacts* (ed. by M.A. Sutton, S. Reis, and S.M. Baker), pp. 49–58. Springer.
- Sheppard, L.J., Leith, I.D., Crossley, A., Van Dijk, N., Fowler, D., Sutton, M.A. & Woods, C. (2008) Stress responses of *Calluna vulgaris* to reduced and oxidised N applied under “real world conditions”. *Environmental Pollution*, **154**, 404–413.
- Silbury, J.H. (1977) Energy requirement for symbiotic nitrogen fixation. *Nature*, **267**, 149–150.
- Simpson, D., Benedictow, A., Berge, H., Bergström, R., Emberson, L.D., Fagerli, H., Flechard, C.R., Hayman, G.D., Gauss, M., Jonson, J.E., Jenkin, M.E., Nyíri, A., Richter, C., Semeena, V.S., Tsyro, S., Tuovinen, J.-P., Valdebenito, Á. & Wind, P. (2012) The EMEP MSC-W chemical transport model – technical description. *Atmospheric Chemistry and Physics*, **12**, 7825–7865.
- Simpson, D., Fagerli, H., Hellsten, S., Knulst, J.C. & Westling, O. (2006) Comparison of modelled and monitored deposition fluxes of sulphur and nitrogen to ICP-forest sites in Europe. *Biogeosciences*, **3**, 337–355.
- Simpson, G.L. (2009) cocorresp: Co-correspondence analysis ordination methods.
- Smith, V.H., Tilman, G.D. & Nekola, J.C. (1998) Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, **100**, 179–196.
- Soudzilovskaia, N.A., Onipchenko, V.G., Cornelissen, J.H.C. & Aerts, R. (2005) Biomass production, N: P ratio and nutrient limitation in a Caucasian alpine tundra plant community. *Journal of Vegetation Science*, **16**, 399–406.
- Soudzilovskaia, N.A., Onipchenko, V.G., Cornelissen, J.H.C. & Aerts, R. (2007) Effects of fertilisation and irrigation on “foliar afterlife” in alpine tundra. *Journal of Vegetation Science*, **18**, 755–766.
- Sparks, J.P. (2009) Ecological ramifications of the direct foliar uptake of nitrogen. *Oecologia*, **159**, 1–13.
- Spasojevic, M., Bowman, W., Humphries, H.C., Seastedt, T. & Suding, K.N. (2013) Changes in alpine vegetation over 21 years: Are patterns across a heterogeneous landscape consistent with predictions? *Ecosphere*, **4**, 117.
- Stevens, C., Duprè, C., Gaudnik, C., Dorland, E., Dise, N., Gowing, D., Bleeker, A., Alard, D., Bobbink, R., Fowler, D., Vandvik, V., Corcket, E., Mountford, J.O., Aarrestad, P.A., Muller, S. & Diekmann, M. (2011) Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition. *Journal of Vegetation Science*, **22**, 207–215.

- Stevens, C.J., Dise, N.B., Mountford, J.O. & Gowing, D.J. (2004) Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. *Science*, **303**, 1876–9.
- Stevens, C.J., Duprè, C., Dorland, E., Gaudnik, C., Gowing, D.J.G., Bleeker, A., Diekmann, M., Alard, D., Bobbink, R., Fowler, D., Corcket, E., Mountford, J.O., Vandvik, V., Aarrestad, P.A., Muller, S. & Dise, N.B. (2010) Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. *Environmental pollution*, **158**, 2940–5.
- Susfalk, R. & Johnson, D. (2002) Ion exchange resin based soil solution lysimeters and snowmelt solution collectors. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **33**, 1261–1275.
- Sutton, M.A., Howard, C.M., Erisman, J.W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., van Grinsven, H. & Grizzetti, B. (2011) *The European Nitrogen Assessment: Sources, Effects and Policy Perspectives*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Suzuki, S. & Kudo, G. (1997) Short-term effects of simulated environmental change on phenology, leaf traits, and shoot growth of alpine plants on a temperate mountain, northern Japan. *Global Change Biology*, **3**, 108–115.
- Sverdrup, H., Belyazid, S., Nihlgard, B. & Ericson, L. (2007) Modelling change in ground vegetation response to acid and nitrogen pollution, climate change and forest management at in Sweden 1500-2100 A.D. *Water Air Soil Pollution, Focus* **7**, 163-79.
- Swall, J.L. & Foley, K.M. (2009) The impact of spatial correlation and incommensurability on model evaluation. *Atmospheric Environment*, **43**, 1204–1217.
- Teskey, R.O. (1995) A Field-Study of the Effects of Elevated CO₂ on Carbon Assimilation, Stomatal Conductance and Leaf and Branch Growth of Pinus-Taeda Trees. *Plant Cell and Environment*, **18**, 565–573.
- Teskey, R.O. (1997) Combined effects of elevated CO₂ and air temperature on carbon assimilation of Pinus faeda trees. *Plant, Cell and Environment*, **20**, 373–380.
- Theodose, T.A., Jaeger, C.H., Bowman, W.D. & Schardt, J.C. (1996) Uptake and allocation of ¹⁵N in alpine plants: implications for the importance of competitive ability in predicting community structure in a stressful environment. *Oikos*, **75**, 59–66.
- Thöni, L., Brang, P., Braun, S., Seitler, E. & Rihm, B. (2004) Ammonia monitoring in Switzerland with passive samplers: patterns, determinants and comparison with modelled concentrations. *Environmental Monitoring and Assessment*, **98**, 93–107.
- Tie, X., Zhang, R., Brasseur, G.U.Y. & Lei, W. (2002) Global NO_x Production by Lightning. *Journal of Atmospheric Chemistry*, **43**, 61–74.
- Turner, M.M. & Henry, H.A.L. (2009) Interactive effects of warming and increased nitrogen deposition on ¹⁵N tracer retention in a temperate old field: seasonal trends. *Global Change Biology*, **15**, 2885–2893.
- Uscola, M., Villar-Salvador, P., Olet, J. & Warren, C.R. (2014) Foliar absorption and root translocation of nitrogen from different chemical forms in seedlings of two Mediterranean trees. *Environmental and Experimental Botany*, **104**, 34–43.
- Vestreng, V. (2003) *Review and revision, emission data reported to CLRTAP*, Oslo, Norway.
- Vingiani, S., Adamo, P. & Giordano, S. (2004) Sulphur, nitrogen and carbon content of Sphagnum capillifolium and Pseudevernia furfuracea exposed in bags in the Naples urban area. *Environmental Pollution*, **129**, 145–158.
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H. & Tilman, D.G. (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications*, **7**, 737–750.
- Vitousek, P.M. & Howarth, R.W. (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea : How can it occur ? *Biogeochemistry*, **13**, 87–115.

- Vitousek, P.M., Menge, D.N.L., Reed, S.C. & Cleveland, C.C. (2013) Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **368**, 20130119.
- Vittoz, P., Randin, C., Dutoit, A., Bonnet, F. & Hegg, O. (2009) Low impact of climate change on subalpine grasslands in the Swiss Northern Alps. *Global Change Biology*, **15**, 209–220.
- Voss, M., Bange, H.W., Dippner, J.W., Middelburg, J.J., Montoya, J.P. & Ward, B. (2013) The marine nitrogen cycle : recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **368**, 20130121.
- De Vries, W., van der Salm, C., Reinds, G.J. & Erisman, J.W. (2007) Element fluxes through European forest ecosystems and their relationships with stand and site characteristics. *Environmental Pollution*, **148**, 501–513.
- Van Vuuren, D.P., Bouwman, L.F., Smith, S.J. & Dentener, F. (2011) Global projections for anthropogenic reactive nitrogen emissions to the atmosphere: An assessment of scenarios in the scientific literature. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, **3**, 359–369.
- Wahren, C., Camac, J., Jarrad, F., Williams, R.J., Papst, W. & Hoffmann, A. (2013) Experimental warming and long-term vegetation dynamics in an alpine heathland. *Australian Journal of Botany*, **61**, 36–51.
- Wang, Q., Shixiong, L., Zengchun, J. & Wenying, W. (2008) Response of carbon and nitrogen content in plants and soils to vegetation cover change in alpine Kobresia meadow of the source region of Lantsang, Yellow and Yangtze Rivers. *Acta Ecologica Sinica*, **28**, 885–894.
- Ward, B.B., Devol, A.H., Rich, J.J., Chang, B.X., Bulow, S.E., Naik, H., Pratihary, A. & Jayakumar, A. (2009) Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea. *Nature*, **461**, 78–81.
- Wei, C., Yu, Q., Bai, E., Lü, X., Li, Q., Xia, J., Kardol, P., Liang, W., Wang, Z. & Han, X. (2013) Nitrogen deposition weakens plant-microbe interactions in grassland ecosystems. *Global change biology*, **19**, 3688–3697.
- Weih, M. & Karlsson, P.S. (1999) Growth response of altitudinal ecotypes of mountain birch to temperature and fertilisation. *Oecologia*, **119**, 16–23.
- Weih, M. & Karlsson, P.S. (2001) Growth response of mountain birch to air and soil temperature: Is increase leaf-nitrogen content acclimation to lower air temperature? *New Phytologist*, **150**, 147–155.
- Van Wijk, M.T., Williams, M., Gough, L., Hobbie, S.E. & Shaver, G.R. (2003) Luxury consumption of soil nutrients: a possible competitive strategy in above-ground and below-ground biomass allocation and root morphology for slow-growing arctic vegetation? *Journal of Ecology*, **91**, 664–676.
- Williams, M.W., Brooks, P.D., Mosier, A. & Tonnessen, K.A. (1996) Mineral nitrogen transformations in and under seasonal snow in a high-elevation catchment in the Rocky Mountains, United States. *Water Resources Research*, **32**, 3161–3171.
- Williams, M.W. & Melack, J.M. (1991) Solute chemistry of snowmelt and runoff in an alpine basin, Sierra Nevada. *Water Resources Research*, **27**, 1575–1588.
- Windmaïßer, T. & Reisch, C. (2013) Long-term study of an alpine grassland: local constancy in times of global change. *Alpine Botany*, **123**, 1–6.
- Wood, S. (2014) Mixed GAM Computation Vehicle with GCV/AIC/REML smoothness estimation (mgcv).
- Wrage, N., Velthof, G.L., Van Beusichem, M.L. & Oenema, O. (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**, 1723–1732.
- Xia, J. & Wan, S. (2013) Independent effects of warming and nitrogen addition on plant phenology in the Inner Mongolian steppe. *Annals of botany*, **111**, 1207–17.

- Zapletal, M., Kuňák, D. & Chroust, P. (2007) Chemical characterization of rain and fog water in the Cervenohorske Sedlo (Hruby Jeseník Mountains, Czech Republic). *Water, Air, and Soil Pollution*, **186**, 85–96.
- Zavaleta, E.S., Shaw, M.R., Chiariello, N.R., Mooney, H.A. & Field, C.B. (2003) Additive effects of simulated climate changes, elevated CO₂, and nitrogen deposition on grassland diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 7650–4.
- Zelený, D. & Schaffers, A.P. (2012) Too good to be true: pitfalls of using mean Ellenberg indicator values in vegetation analyses. *Journal of Vegetation Science*, **23**, 419–431.

AUTEUR : Marion BOUTIN

TITRE : Impacts des dépôts atmosphériques azotés sur la biodiversité et le fonctionnement des pelouses subalpines pyrénéennes

DIRECTEUR(S) DE THESE : André PORNON et Thierry LAMAZE

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Université Paul Sabatier – Toulouse 3, le 28 septembre 2015

RÉSUMÉ :

Les dépôts azotés (DA) mesurés à l'étage subalpin des Pyrénées sont compris entre 8 et 15 kg N ha⁻¹ an⁻¹, soit égaux ou supérieurs à la charge critique actuellement définie pour ces milieux et supérieurs aux estimations fournies par les modèles de chimie-transport. Au cours des soixante dernières années, les pelouses subalpines pyrénéennes sont devenues plus thermophiles et mésotrophes, plus riches en espèces et plus homogènes à l'échelle des Pyrénées. Le changement climatique (CC) et le cumul de DA ont réduit les contraintes abiotiques de ces habitats, favorisant l'installation d'espèces moins stress-tolérantes. Ces milieux piègent et conservent efficacement l'azote d'origine atmosphérique, même en contexte de CC. Des effets des DA sont détectables sur la végétation (%N, biomasse et recouvrement de certains groupes) avant d'être détectables dans le sol. Ces effets sont plus marqués en réponse aux apports dominés par l'ammonium plutôt que par le nitrate, et sont additifs ou compensatoires avec ceux du CC, mais rarement interactifs.

MOTS-CLES : azote, dépôts atmosphériques, pelouses, subalpin, biodiversité, Pyrénées

TITLE: Impacts of atmospheric nitrogen deposition on the biodiversity and the functioning of Pyrenean subalpine grasslands

ABSTRACT:

Atmospheric nitrogen deposition in the subalpine Pyrenees is in order of 8 to 15 kg N ha⁻¹ yr⁻¹, equivalent or higher than the actual critical load for these habitats and higher than chemistry-transport models' estimates. During the past six decades, Pyrenean subalpine grasslands became more thermophilous and mesotrophic, richer in species and more homogeneous at the regional scale. Climate change and cumulative nitrogen deposition reduced the abiotic constraints in these habitats, favouring the installation of less stress-tolerant species. These habitats trap and store efficiently nitrogen from deposition, even in a climate change context. Effects are visible in the vegetation (% of nitrogen, biomass and cover of some groups) before being visible in the soil. These effects are more pronounced following ammonium than nitrate dominated additions, and are additive or compensatory with the effects of climate change, but rarely interactive.

KEYWORDS: nitrogen, atmospheric deposition, grasslands, subalpine, biodiversity, Pyrenees

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Ecologie, biodiversité et évolution

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire Evolution et Diversité Biologique (EDB), UMR5174 UPS-CNRS-ENFA,
Université Paul Sabatier - Toulouse 3, Bâtiment 4R1
118, route de Narbonne, 31062 TOULOUSE CEDEX 9